



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 714**

51 Int. Cl.:

A61K 31/498 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **93916620 .3**

96 Fecha de presentación : **17.06.1993**

97 Número de publicación de la solicitud: **0647137**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.1995**

54

Título: **Antagonistas de receptores de glicina y uso de los mismos.**

30

Prioridad: **22.06.1992 US 903080**
22.12.1992 US 995167
28.05.1993 US 69274

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73

Titular/es:
The Regents of the University of California
300 Lakeside Drive, 22nd Floor
Oakland, California 94612-3550, US
State of Oregon Through Oregon State Board of
Higher Education for and on behalf of Oregon
Health Sc. Univ. & Univ. of Oregon

72

Inventor/es: **Weber, Eckard y**
Keana, John F. W.

74

Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 313 714 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de receptores de glicina y uso de los mismos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está en el campo de la química médica. La presente invención se refiere a compuestos que tienen alta afinidad por el sitio de unión a glicina, que carecen de efectos secundarios de PCP y que atraviesan la barrera hematoencefálica a altos niveles. En particular, la presente invención se refiere al uso de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la degeneración neuronal asociada a isquemia, estados fisiopatológicos asociados a degeneración neuronal, convulsiones, ansiedad, dolor crónico e inducir anestesia. La invención también se refiere al uso de ciertas sales de amonio sumamente solubles de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas.

15 **Antecedentes de la invención**

Se cree que el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro. Hay tres subtipos principales de receptores de glutamato en el SNC. Éstos se denominan comúnmente receptores de cainato, AMPA y N-metil-D-aspartato (NMDA) (Watkins y Olverman, Trends in Neurosci. 7:265-272 (1987)). Se encuentran receptores de NMDA en las membranas de prácticamente todas las neuronas en el cerebro. Los receptores de NMDA son canales catiónicos activados por ligando que permiten que permeen Na^+ , K^+ y Ca^{++} cuando se activan mediante glutamato o aspartato (agonistas no selectivos, endógenos) o mediante NMDA (un agonista selectivo, sintético) (Wong y Kemp, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 31:401-425 (1991)).

El glutamato solo no puede activar el receptor de NMDA. Con el fin de activarse mediante glutamato, el canal del receptor de NMDA debe unirse en primer lugar a glicina en un sitio de unión a glicina específico, de alta afinidad que está separado del sitio de unión a glutamato/NMDA en la proteína receptora (Johnson y Ascher, Nature 325:329-331 (1987)). Por tanto, la glicina es un coagonista obligatorio en el complejo receptor/canal de NMDA (Kemp, J.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6547-6550 (1988)).

Además de los sitios de unión para glutamato/NMDA y glicina, el receptor de NMDA porta otros varios sitios de unión funcionalmente importantes. Éstos incluyen sitios de unión para Mg^{++} , Zn^{++} , poliaminas, ácido araquidónico y fenciclidina (PCP) (Reynolds y Miller, Adv. in Pharmacol. 21:101-126 (1990); Miller, B., et al., Nature 355:722-725 (1992)). El sitio de unión de PCP (denominado ahora comúnmente receptor de PCP) está situado en el interior del poro del ionóforo del complejo receptor/canal de NMDA (Wong, E.H.F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7104-7108 (1986); Huettner y Bean, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1307-1311 (1988); MacDonald, J.F., et al., Neurophysiol. 58:251-266 (1987)). Con el fin de que PCP tenga acceso al receptor de PCP, en primer lugar el canal debe abrirse mediante glutamato y glicina. En ausencia de glutamato y glicina, PCP no puede unirse al receptor de PCP aunque algunos estudios han sugerido que puede producirse una pequeña cantidad de unión de PCP incluso en ausencia de glutamato y glicina (Sircar y Zukin, Brain Res. 556:280-284 (1991)). Una vez que PCP se une al receptor de PCP, bloquea el flujo iónico a través del canal abierto. Por tanto, PCP es un bloqueante de canal abierto y un antagonista no competitivo de glutamato en el complejo receptor/canal de NMDA.

Uno de los fármacos más potentes y selectivos que se unen al receptor de PCP es el fármaco anticonvulsivo MK801. Este fármaco tiene una K_d de aproximadamente 3 nM en el receptor de PCP (Wong, E.H.F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7104-7108 (1986)).

Tanto PCP como MK801 así como otros ligandos del receptor de PCP [por ejemplo dextrometorfano, ketamina y N,N'-guanidinas disustituidas] tienen eficacia neuroprotectora tanto *in vitro* como *in vivo* (Gill, R., et al., J. Neurosci. 7:3343-3349 (1987); Keana, J.F.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5631-5635 (1989); Steinberg, G.K., et al., Neuroscience Lett. 89: 193-197 (1988); Church, J., et al., en: Sigma and Phencyclidine-Like Compounds as Molecular Probes in Biology, Domino y Kamenka, eds., Ann Arbor: NPP Books, págs. 747-756 (1988)). La eficacia neuroprotectora bien caracterizada de estos fármacos se debe en gran parte a su capacidad para bloquear la entrada excesiva de Ca^{++} en las neuronas a través de los canales del receptor de NMDA que se sobreactivan mediante la liberación excesiva de glutamato en condiciones de isquemia cerebral (por ejemplo en accidente cerebrovascular, isquemia por paro cardíaco, etc.) (Collins, R.C., Metabol. Br. Dis. 1:231-240 (1986); Collins, R.C., et al., Annals Int. Med. 110:992-1000 (1989)).

Sin embargo, el potencial terapéutico de estos fármacos de receptor de PCP como agentes de rescate de la isquemia en accidente cerebrovascular se ha dificultado gravemente por el hecho de que estos fármacos tienen fuertes efectos secundarios de comportamiento de tipo PCP (efectos de comportamiento psicotomiméticos) que parecen deberse a la interacción de estos fármacos con el receptor de PCP (Tricklebank, M.D., et al., Eur. J. Pharmacol. 167:127-135 (1989); Koek, W., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 245:969 (1989); Willets y Balster, Neuropharmacology 27:1249 (1988)). Estos efectos secundarios de comportamiento de tipo PCP parecen haber producido la retirada de MK801 del desarrollo clínico como agente de rescate de la isquemia. Además, estos ligandos del receptor de PCP parecen tener potencial de riesgo de drogadicción considerable tal como se demostró mediante la propensión a dar lugar a drogadicción del propio PCP.

ES 2 313 714 T3

Los efectos de comportamiento de tipo PCP de los ligandos del receptor de PCP pueden demostrarse en modelos animales: PCP y ligandos del receptor de PCP relacionados producen una excitación del comportamiento (hiperlocomoción) en roedores (Tricklebank, M.D., *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 167:127-135 (1989)) y una catalepsia característica en palomas (Koek, W., *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 245:969 (1989); Willets y Balster, Neuropharmacology 27:1249 (1988)); en paradigmas de discriminación de fármacos, hay una fuerte correlación entre la afinidad por el receptor de PCP de estos fármacos y su potencia para inducir un comportamiento de respuesta apropiado de PCP (Zukin, S.R., *et al.*, Brain Res. 294:174 (1984); Brady, K.T., *et al.*, Science 215:178 (1982); Tricklebank, M.D., *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 141:497 (1987)).

Los fármacos que actúan como antagonistas competitivos en el sitio de unión a glutamato del receptor de NMDA tales como CGS 19755 y LY274614 tienen también eficacia neuroprotectora debido a que estos fármacos (como los ligandos del receptor de PCP) pueden impedir el flujo excesivo de Ca⁺⁺ a través de receptor/canales de NMDA en la isquemia (Boast, C.A., *et al.*, Brain Res. 442:345-348 (1988); Schoepp, D.D., *et al.*, J. Neural. Trans. 85:131-143 (1991)). Sin embargo, los antagonistas competitivos del receptor de NMDA tienen también efectos secundarios de comportamiento de tipo PCP en modelos animales (excitación del comportamiento, actividad en pruebas de discriminación de fármacos tipo PCP) aunque de manera no tan potente como MK801 y PCP (Tricklebank, M.D., *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 167:127-135 (1989)).

Una forma alternativa de inhibir la activación del canal del receptor de NMDA es usando antagonistas en el sitio de unión a glicina del receptor de NMDA. Dado que la glicina debe unirse al sitio de glicina con el fin de que el glutamato efectúe la apertura del canal (Johnson y Ascher, Nature 325:329-331 (1987); Kemp, J.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6547-6550 (1988)), un antagonista de glicina puede impedir completamente el flujo iónico a través del canal del receptor de NMDA (incluso en presencia de una gran cantidad de glutamato).

Estudios de microdiálisis *in vivo* recientes han demostrado que en el modelo de isquemia focal de la rata, hay un gran aumento en la liberación de glutamato en la región isquémica del cerebro sin aumento significativo en la liberación de glicina (Globus, M.Y.T., *et al.*, J. Neurochem. 57:470-478 (1991)). Por tanto, teóricamente, los antagonistas de glicina deben ser agentes neuroprotectores muy poderosos, debido a que pueden impedir la apertura de los canales de NMDA mediante el glutamato de manera no competitiva y por tanto (a diferencia de los antagonistas competitivos de NMDA), no han de superar las grandes concentraciones de glutamato endógeno que se liberan en la región isquémica del cerebro.

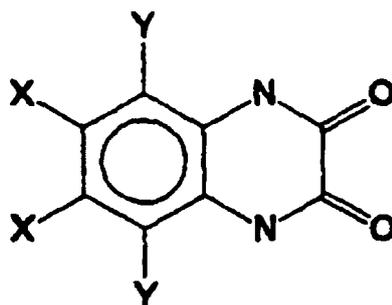
Además, debido a que los antagonistas de glicina no actúan ni en los sitios de unión de glutamato/NMDA ni de PCP para impedir la apertura del canal de NMDA, estos fármacos podrían no producir el efecto secundario de comportamiento de tipo PCP observado tanto con ligandos del receptor de PCP como con antagonistas competitivos del receptor de NMDA (Tricklebank, M.D., *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 167:127-135 (1989); Koek, W., *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 245:969 (1989); Willets y Balster, Neuropharmacology 27:1249 (1988); Tricklebank, M.D., *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 167:127-135 (1989); Zukin, S.R., *et al.*, Brain Res. 294:174 (1984); Brady, K.T., *et al.*, Science 215:178 (1982); Tricklebank, M.D., *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 141:497 (1987)). Recientes estudios han sugerido que los antagonistas de glicina pueden carecer de hecho de efectos secundarios de comportamiento de tipo PCP, en los que se inyectaron antagonistas de glicina directamente en los cerebros de roedores sin dar como resultado comportamientos de tipo PCP (Tricklebank, M.D., *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 167:127-135 (1989)).

Sin embargo, ha habido dos problemas principales que han impedido el desarrollo de antagonistas de glicina como agentes neuroprotectores clínicamente útiles:

A. la mayoría de los antagonistas de glicina disponibles con afinidad de unión al receptor relativamente alta *in vitro* tal como el ácido 7-Cl-quinurénico (Kemp, J.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6547-6550 (1988)), el ácido 5,7-dicloroquinurénico (McNamara, D., *et al.*, Neuroscience Lett. 120:17-20 (1990)) y el ácido indol-2-carboxílico (Gray, N.M., *et al.*, J. Med. Chem. 34: 1283-1292 (1991)) no pueden atravesar la barrera hematoencefálica y por tanto no tienen utilidad como agentes terapéuticos;

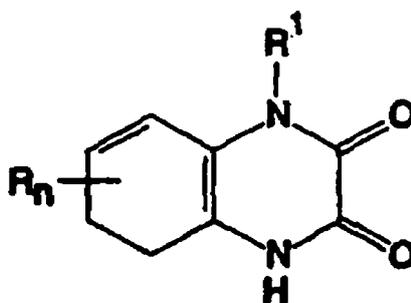
B. el único antagonista de glicina disponible que penetra suficientemente en la barrera hematoencefálica, el fármaco HA-966 (Fletcher y Lodge, Eur. J. Pharmacol. 151:161-162 (1988)), es un agonista parcial con una afinidad sólo micromolar por el sitio de unión a glicina. La eficacia neuroprotectora para HA-966 *in vivo* no se ha demostrado por tanto ni se ha demostrado para los otros antagonistas de glicina disponibles debido a que carecen de biodisponibilidad *in vivo*.

Ha habido varios informes en la bibliografía de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas sustituidas que son útiles para tratar estados fisiopatológicos mediados por los receptores de glicina, NMDA y que no son de NMDA. Por ejemplo, la patente estadounidense número 4.975.430 (1990), da a conocer compuestos de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona de fórmula:



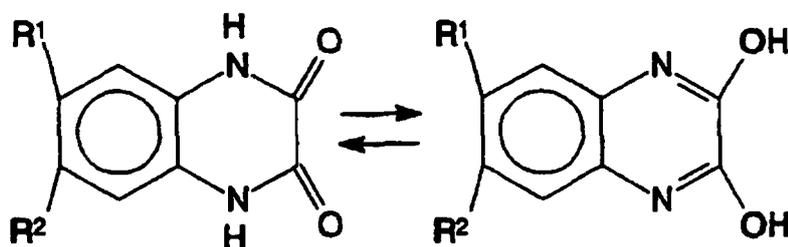
15 en la que cada X es independientemente nitro o ciano y en la que cada Y es independientemente H, alquilo inferior, alcoxilo inferior o CF₃. Según se informa, estos compuestos son útiles para el tratamiento de estados neuronales asociados a la estimulación del receptor de NMDA.

20 La patente estadounidense número 3.962.440 (1976), da a conocer compuestos de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona que tienen la fórmula:



40 en la que R¹ puede ser hidrógeno o metilo, R_n puede ser alquilo inferior, alcoxilo inferior, alquiltio inferior, ciclopropilo, nitro, ciano, halógeno, fluoroalquilo de C₁-C₂ (trifluorometil)amino o amino sustituido y n puede ser 0, 1 ó 2. Según se informa, estos compuestos son útiles como agentes hipnóticos.

45 La patente estadounidense número 4.812.458 (1989) da a conocer compuestos de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona que tienen la fórmula:

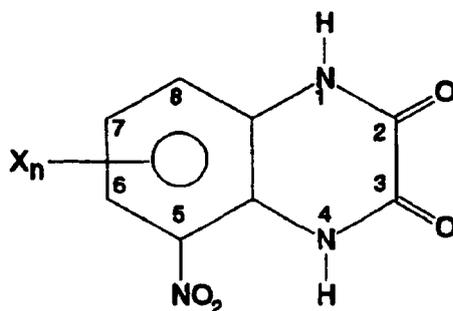


60 en la que R¹ es halógeno, ciano, trifluorometilo, etinilo o N₃ y R² es SO₂-alquilo C₁₋₃, trifluorometilo, nitro, etinilo o ciano. Según se informa, estos compuestos son útiles para el tratamiento de indicaciones producidas por hiperactividad de los neurotransmisores excitadores, particularmente los receptores de quisqualato, y como neurolépticos.

65

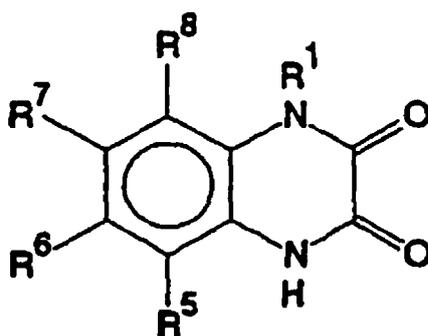
ES 2 313 714 T3

La patente estadounidense número 4.659.713 (1987) da a conocer compuestos de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona que tienen la fórmula:



en la que X representa hidrógeno, cloro, bromo, fluoro, yodo, triclórometilo, diclorofluorometilo, difluorometilo o trifluorometilo, y n representa 1 ó 2. Según se informa, estos compuestos son útiles para el control de la coccidiosis en animales.

La patente estadounidense número 4.948.794 (1990) da a conocer compuestos de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona que tienen la fórmula:



en la que

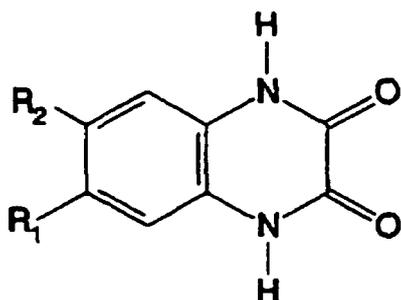
R^1 es alquilo C_{1-12} , que puede estar opcionalmente sustituido con hidroxilo, formilo, carboxilo, ésteres carboxílicos, amidas o aminas, cicloalquilo C_{3-8} , arilo, aralquilo; y en la que R^6 es hidrógeno, halógeno, CN, CF_3 , NO_2 u OR' , en el que R' es alquilo C_{1-4} y R^5 , R^7 y R^8 es hidrógeno, siempre que R^6 no sea CF_3 , OCH_3 , NO_2 , C^1 o Br cuando R^1 es CH_3 ; o

R^6 y R^7 son independientemente NO_2 , halógeno, CN, CF_3 u OR' , en el que R' es alquilo C_{1-4} y R^5 y R^8 son cada uno hidrógeno; o

R^5 y R^6 forman juntos un anillo aromático condensado adicional, que puede estar sustituido con halógeno, NO_2 , CN, CF_3 u OR' , en el que R' es alquilo C_{1-4} ; o

R^7 y R^8 forman juntos un anillo aromático condensado adicional, que puede estar sustituido con halógeno, NO_2 , CN, CF_3 u OR' , en el que R' es alquilo C_{1-4} y R^5 y R^6 son independientemente hidrógeno, halógeno, CN, CF_3 , NO_2 u OR' , en el que R' es alquilo C_{1-4} . Según se informa, estos compuestos son útiles para el tratamiento de indicaciones producidas por hiperactividad de los neurotransmisores excitadores, particularmente los receptores de quisqualato, y como neurolépticos.

Yoneda y Ogita, Biochem. Biophys. Res. Commun. 164:841-849 (1989), dan a conocer que las siguientes 1,4-dihidroquinoxalin-1,2-dionas desplazan de manera competitiva la unión insensible a estriquina de [3H]glicina, sin afectar a los otros sitios de unión del complejo del receptor de NMDA:



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

5
10
15

Según los autores, las relaciones de estructura-actividad entre quinoxalinas indican claramente que ambos grupos cloruro de las posiciones 6 y 7 en el anillo de benceno son cruciales para la potencia de antagonista contra los sitios de Gly. La eliminación de un cloruro de la molécula da como resultado una reducción de 10 veces en la afinidad por los sitios de Gly.

Kleckner y Dingleline, Mol. Pharm. 36:430-436 (1989) dan a conocer que la 6,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y la 6-ciano-7-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona son antagonistas más potentes de cainato que la glicina, pero la sustitución del Cl en la posición 6 y especialmente en las posiciones 6 y 7 aumenta la potencia en el sitio de glicina. Además, los autores sugieren que los antagonistas del sitio de glicina podrían ser eficaces contra neuropatologías mediadas por el receptor de NMDA.

Rao, T.S. *et al.*, Neuropharmacology 29:1031-1035 (1990), dan a conocer que la 6,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y la 7-ciano-6-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona antagonizan respuestas mediadas por sitios de reconocimiento de glicina asociados a NMDA *in vivo*.

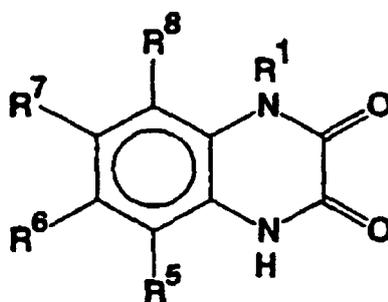
Pellegrini-Giampietro, D.E. *et al.*, Br. J. Pharmacol. 98:1281-1286 (1989), dan a conocer que la 6-ciano-7-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y la 6,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona pueden antagonizar las respuestas a L-glutamato interaccionando con los sitios de reconocimiento de glicina del complejo de canal iónico de receptor de NMDA.

Ogita y Yoneda, J. Neurochem. 54:699-702 (1990) dan a conocer que la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es un antagonista competitivo específico para los sitios de unión a [3H]glicina insensibles a estriquina en el complejo del receptor de NMDA. Según los autores, los dos radicales cloruro en las posiciones 6 y 7 en el anillo de benceno de la quinoxalina son cruciales para la potencia antagonística contra los sitios de unión a glicina.

Kessler, M. *et al.*, Brain Res. 489:377-382 (1989) dan a conocer que la 6,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y la 6-ciano-7-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona inhiben la unión de [3H]glicina a los sitios de unión a glicina insensibles a estriquina asociados a los receptores de NMDA.

La publicación de solicitud de patente europea número 0 377 112, publicada el 11 de julio de 1990, da a conocer compuestos de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona que tienen la fórmula:

50
55
60



en la que, entre otros, R^1 puede ser hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, aralquiloxilo, cicloalquilalcoxilo, cicloalcoxilo o aciloxilo; y R^5 , R^6 , R^7 y R^8 pueden ser independientemente hidrógeno, nitro, halógeno, ciano, trifluorometilo, $SO_2NR'R''$, SO_2R' u OR' , en el que R' es hidrógeno o alquilo C_{1-4} . Según se informa, estos compuestos son útiles para el tratamiento de indicaciones producidas por hiperactividad de los neurotransmisores excitadores, particularmente los receptores de quisqualato, y como neurolépticos.

65

ES 2 313 714 T3

Lester, R.A. *et al.*, Mol. Pharm. 35:565-570 (1989) dan a conocer que la 6-ciano-7-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona antagoniza respuestas mediadas por receptores de NMDA, mediante una interacción competitiva del sitio de unión a glicina.

5 Patel, J. *et al.*, J. Neurochem. 55:114-121 (1990) dan a conocer que la actividad neuroprotectora de la 6,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona se debe al antagonismo de la actividad de coagonista de la glicina en el complejo receptor-canal de NMDA.

Horner, L. *et al.*, Chem. Abstracts 48:2692 (1953) dan a conocer la 6,8-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona.

10 Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc.: 1170-1176 (1962), dan a conocer la 6,7-dibromo-2,3-dihidroquinoxalina (también conocida como 6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona).

15 Honore, T. *et al.*, Science 241:701-703 (1988), dan a conocer que la 6,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y la 7-ciano-6-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona son potentes antagonistas del receptor de glutamato que no es de NMDA.

20 Sheardown, M.J. *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 174:197-204 (1989), dan a conocer que la 5,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es un potente antagonista del receptor de glicina insensible a estricnina y que tiene propiedades anticonvulsivas. Sin embargo, Sheardown *et al.* también dan a conocer que la 5,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona así como DNQX y CNQX tienen un mal acceso al sistema nervioso central.

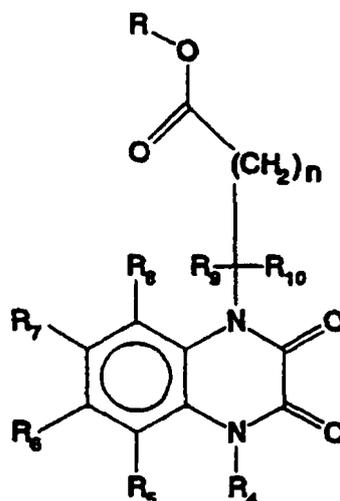
La publicación de solicitud internacional número WO91/13878 da a conocer las siguientes 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas N-sustituidas que se unen al receptor de glicina:

25

30

35

40

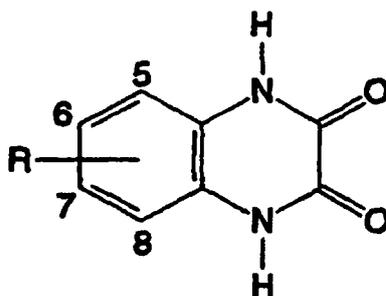


45 en la que R representa hidrógeno, alquilo C₁₋₆ o aralquilo y n es un número entero desde 0 hasta 5; R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo; R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ representan independientemente hidrógeno, nitro, halógeno, alcoxilo, ariloxilo, aralcoxilo, alquilo C₁₋₆ o arilo; R⁹ representa hidrógeno, alquilo inferior o arilo; R¹⁰ representa hidrógeno o alquilo, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

50 Leeson *et al.*, J. Med. Chem. 34:1243-1252 (1991) dan a conocer varios derivados del antagonista de aminoácido excitador no selectivo ácido quinurénico. También dan a conocer varias quinoxalin-2,3-dionas estructuralmente relacionadas que también son antagonistas de glicina/NMDA pero que no son selectivos y son mucho menos potentes que los derivados de ácido quinurénico. Las quinoxalin-2,3-dionas tienen la estructura:

55

60

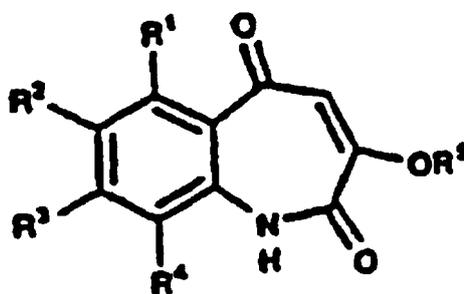


65

en la que R es H, 5-Cl, 7-Cl, 5,7-Cl₂, 6,7-Cl₂, 6,7-(CH₃)₂, 6-NO₂ o 6,7-(NO₂)₂. También dan a conocer varios derivados de N-metilo.

ES 2 313 714 T3

Swartz *et al.*, Mol. Pharmacol. 41:1130-1141 (1992) dan a conocer que ciertas benzapinas sustituidas y no sustituidas son antagonistas competitivos de los canales del receptor de glutamato en neuronas corticales en cultivo. Véase también la publicación de solicitud internacional número WO92/11854 que da a conocer que los compuestos de fórmula



en la que R¹-R⁴ pueden ser hidrógeno, perfluoroalquilo C₁₋₃, halógeno, nitro o ciano y R⁵ puede ser hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₅, son antagonistas del sitio de unión a glicina en el complejo del receptor de NMDA.

Sigue habiendo una necesidad de antagonistas de glicina/NMDA potentes y selectivos, que

- carezcan de los efectos secundarios de comportamiento de tipo PCP comunes para los bloqueantes de canales de NMDA de tipo PCP tales como MK801 o para los antagonistas competitivos de los receptores de NMDA tales como CGS19755;
- muestren una eficacia antiisquémica potente debido a la naturaleza no competitiva de su antagonismo del glutamato en el receptor de NMDA;
- atraviesen la barrera hematoencefálica a niveles suficientes para la eficacia;
- tengan utilidad como anticonvulsivos novedosos con menos efectos secundarios que los bloqueantes de los canales de NMDA de tipo PCP o los antagonistas competitivos de NMDA;
- ayuden en la definición de la significación funcional del sitio de unión a glicina del receptor de NMDA *in vivo*.

40 Sumario de la invención

La invención se refiere al descubrimiento de una clase de compuestos que presentan alta afinidad por el sitio de unión a glicina insensible a estricnina, que no presentan efectos secundarios de PCP y que atraviesan la barrera hematoencefálica a altos niveles. Esto es a diferencia de los informes en la bibliografía de que otros compuestos, por ejemplo HA-966 y 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas particulares, que o bien no atraviesan la barrera hematoencefálica o bien lo hacen a bajos niveles. Además, muchos de estos compuestos presentan baja afinidad de unión a otros sitios del receptor. Por tanto, se dan a conocer en el presente documento compuestos que tienen alta afinidad por el sitio de unión a glicina, que carecen de efectos secundarios de PCP y que atraviesan la barrera hematoencefálica a altos niveles. Por tanto, los compuestos de la presente invención son extremadamente útiles para tratar estados fisiopatológicos, sin toxicidad o efectos secundarios significativos.

La invención se refiere al uso de tales compuestos para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la pérdida neuronal asociada con accidente cerebrovascular, isquemia, traumatismo del SNC, hipoglucemia y cirugía, así como el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas incluyendo enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y síndrome de Down, el tratamiento o la prevención de las consecuencias adversas de la sobreestimulación de los aminoácidos excitadores, así como el tratamiento de la ansiedad, convulsiones, dolor crónico, psicosis y la inducción de anestesia.

Tales compuestos tienen la fórmula representada en la reivindicación 1.

60 Descripción de las figuras

La figura 1 de referencia representa un gráfico de barras que demuestra la actividad locomotriz normal, control en jerbos pretratados con solución salina. Se administraron inyecciones intraperitoneales a jerbos control normales inmediatamente antes del periodo de evaluación de la actividad locomotriz de seis horas. Se utilizaron grupos de 6 jerbos cada uno y los datos se presentan como la media \pm el error estándar.

ES 2 313 714 T3

La figura 2 de referencia representa un gráfico de barras que demuestra los efectos del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre la actividad locomotriz en jerbos control normales (barras en blanco) y animales a los que se les administró 1,0 mg/kg del compuesto (barras en negro). Se administraron inyecciones intraperitoneales del compuesto a los jerbos inmediatamente antes del periodo de evaluación de la actividad locomotriz de seis horas. Se administraron inyecciones de solución salina a los animales control. Se utilizaron grupos de 6 jerbos cada uno y los datos se presentan como la media \pm el error estándar.

La figura 3 de referencia representa un gráfico de barras que demuestra los efectos del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre la actividad locomotriz en jerbos control normales (barras en blanco) y animales a los que se les administraron 3,2 mg/kg del compuesto (barras en negro). Se administraron inyecciones intraperitoneales del compuesto a los jerbos inmediatamente antes del periodo de evaluación de la actividad locomotriz de seis horas. Se administraron inyecciones de solución salina a los animales control. Se utilizaron grupos de 6 jerbos cada uno y los datos se presentan como la media \pm el error estándar.

La figura 4 de referencia representa un gráfico de barras que demuestra los efectos del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre la actividad locomotriz en jerbos control normales (barras en blanco) y animales a los que se les administraron 10 mg/kg del compuesto. Se administraron inyecciones intraperitoneales del compuesto a los jerbos inmediatamente antes del periodo de evaluación de la actividad locomotriz de seis horas. Se administraron inyecciones de solución salina a los animales control. Se utilizaron grupos de 6 jerbos cada uno y los datos se presentan como la media \pm el error estándar.

La figura 5 de referencia representa un gráfico de barras que demuestra los efectos del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre la actividad locomotriz en jerbos control normales (barras en blanco) y animales a los que se les administraron 32 mg/kg del compuesto (barras en negro). Se administraron inyecciones intraperitoneales del compuesto a los jerbos inmediatamente antes del periodo de evaluación de la actividad locomotriz de seis horas. Se administraron inyecciones de solución salina a los animales control. Se utilizaron grupos de 6 jerbos cada uno y los datos se presentan como la media \pm el error estándar.

La figura 6 de referencia representa un gráfico que demuestra los efectos del pretratamiento con solución salina inmediatamente antes del comienzo de un periodo de 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral. Se sometieron a prueba los animales para detectar cambios en la actividad locomotriz durante 4 horas consecutivas tras la lesión por isquemia y reperfusión en comparación con animales control que no recibieron oclusión de la arteria carótida. Los datos se expresan como el valor medio para cada grupo de 6 jerbos a los que se administraron 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral con pretratamiento con solución salina (símbolo en negro) o se pretrataron con solución salina pero sin oclusión de la carótida bilateral (símbolo en blanco). Los animales se colocaron en las cámaras de actividad locomotriz durante las 4 horas consecutivas tal como se indica.

La figura 7 de referencia representa un gráfico que demuestra los efectos del pretratamiento con el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (0,32 mg/kg) inmediatamente antes del comienzo de un periodo de 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral. Se sometieron a prueba los animales para detectar cambios en la actividad locomotriz durante 4 horas consecutivas tras la lesión por isquemia y reperfusión. Los datos se expresan como el valor medio para cada grupo de 6 jerbos a los que se administraron 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral con pretratamiento con el fármaco (símbolo en negro) o se pretrataron con solución salina pero sin oclusión de la carótida bilateral (símbolo en blanco). Los animales se colocaron en las cámaras de actividad locomotriz durante las 4 horas consecutivas tal como se indica.

La figura 8 de referencia representa un gráfico que demuestra los efectos del pretratamiento con el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (3,2 mg/kg) inmediatamente antes del comienzo de un periodo de 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral. Se sometieron a prueba los animales para detectar cambios en la actividad locomotriz durante 4 horas consecutivas tras la lesión por isquemia y reperfusión. Los datos se expresan como el valor medio para cada grupo de 6 jerbos a los que se administraron 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral con pretratamiento con el fármaco (símbolo en negro) o se pretrataron con solución salina pero sin oclusión de la carótida bilateral (símbolo en blanco). Los animales se colocaron en las cámaras de actividad locomotriz durante las 4 horas consecutivas tal como se indica.

La figura 9 de referencia representa un gráfico que muestra los efectos del pretratamiento con el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (10 mg/kg) inmediatamente antes del comienzo de un periodo de 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral. Se sometieron a prueba los animales para detectar cambios en la actividad locomotriz durante 4 horas consecutivas tras la lesión por isquemia y reperfusión. Los datos se expresan como el valor medio para cada grupo de 6 jerbos a los que se administraron 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral con pretratamiento con el fármaco (símbolo en negro) o se pretrataron con solución salina pero sin oclusión de la carótida bilateral (símbolo en blanco). Los animales se colocaron en las cámaras de actividad locomotriz durante las 4 horas consecutivas tal como se indica.

La figura 10 de referencia representa un gráfico que muestra los efectos del pretratamiento con el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (32 mg/kg) inmediatamente antes del comienzo de un periodo de 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral. Se sometieron a prueba los animales para detectar cambios en la actividad locomotriz durante 4 horas consecutivas tras la lesión por isquemia y reperfusión. Los datos

se expresan como el valor medio para cada grupo de 6 jerbos a los que se administraron 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral sin pretratamiento (símbolo en negro) o se pretrataron con solución salina pero sin oclusión de la carótida bilateral (símbolo en blanco). Los animales se colocaron en las cámaras de actividad locomotriz durante las 4 horas consecutivas tal como se indica.

5

La figura 11 de referencia representa un gráfico de barras que muestra los efectos del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre los cambios en la actividad locomotriz de la primera hora en comparación con solución salina y los valores control no isquémicos. Estos datos se resumen a partir de las figuras anteriores e indican que hay una mejora significativa en la actividad locomotriz espontánea de los animales a los que se administró 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona a dosis superiores a 0,32 mg/kg en la primera hora tras la isquemia. En cambio, los animales control que no se expusieron a lesión por isquemia y reperusión demostraron un nivel significativamente alto de actividad locomotriz en la primera hora de exploración en comparación con los jerbos isquémicos.

10

La figura 12 de referencia representa un gráfico de barras que muestra los efectos del pretratamiento con el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre la actividad locomotriz en la 4ª hora de pruebas tras 5 min. de oclusión de la carótida bilateral. Todas las dosis del compuesto protegieron significativamente contra los aumentos de actividad locomotriz producidos de manera rutinaria mediante oclusiones de la carótida bilateral de 5 minutos o más largas. Animales control no expuestos a isquemia demostraron una baja actividad exploratoria que es normal para animales sanos colocados en la cámara de actividad locomotriz durante 4 horas. El pretratamiento con solución salina no pudo interferir con la potenciación posisquémica de la actividad locomotriz que se observa de manera rutinaria. 0,32-32 mg/kg del compuesto redujeron significativamente el aumento provocado por la isquemia de la actividad exploratoria dentro de la área circular de la cámara de actividad locomotriz. Los datos se expresan como la media de 6 sujetos \pm el error estándar.

25

La figura 13 de referencia representa un gráfico de barras que muestra cambios en la actividad locomotriz como resultado del tratamiento con el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (AG1) 24 horas tras la isquemia durante una sesión de pruebas de 1 hora. Se colocaron los animales en las cámaras de actividad locomotriz 24 horas tras la lesión por isquemia y reperusión y se evaluaron para detectar cambios en la actividad locomotriz. Los animales control eran animales no isquémicos control tratados con solución salina o animales no isquémicos control tratados con fármaco colocados en la cámara 24 horas tras la inyección de solución salina/fármaco. Los animales isquémicos (ISC) representan animales a los que se administraron pretratamientos con solución salina y se colocaron en la cámara de actividad locomotriz 24 horas tras el comienzo de la isquemia y reperusión. Estos animales eran también los que se sometieron a prueba para detectar cambios posisquémicos cada hora en la actividad locomotriz representada en las figuras anteriores. Los animales a los que se administró pretratamiento con el compuesto eran animales representados en figuras anteriores para determinar los cambios inmediatos tras la reperusión en el comportamiento. Todos los animales se sometieron a prueba a las 24 horas durante una sesión de 1 hora.

30

La figura 14 de referencia representa un gráfico de barras que muestra los efectos del pretratamiento y el postratamiento con el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona a 32 mg/kg. Los animales control (CON) no recibieron isquemia, los animales control tratados con solución salina (SAL) recibieron isquemia pero con pretratamiento con solución salina en lugar de fármaco. Los animales con pretratamiento recibieron múltiples inyecciones de 32 mg/kg a 6, 4 y 2 horas y 30 minutos antes del comienzo de los 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral. Los animales con postratamiento recibieron dosis a 30 minutos tras la reperusión, 2 horas, 4 horas y 6 horas. Las pruebas se realizaron a las 24 horas tras la reperusión. Cada grupo representa la media \pm el error estándar para 6 animales por grupo de tratamiento. Tal como puede observarse, tanto el pretratamiento como el postratamiento produjeron un efecto protector del comportamiento significativo. Se produjo una clara indicación de protección a 32 mg/kg.

45

La figura 15 de referencia representa un gráfico de barras que muestra los cambios postisquémicos en el resultado en el laberinto de brazos radiales de jerbos expuestos a 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral 24 horas antes y pretratados con las dosis indicadas del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se sometieron a prueba los animales inmediatamente tras someter a prueba la actividad locomotriz para detectar comportamiento de patrulla en un laberinto de 8 brazos. Este laberinto de 8 brazos se ubica en una habitación en la que no se realiza otra investigación. Los 8 brazos eran idénticos en dimensiones y en figuración. No se cebaron los brazos con alimento. Se sometieron a prueba los animales hasta que habían entrado en y explorado cada uno de los 8 brazos. La entrada en un brazo en el que habían entrado anteriormente definió un error. Todos los animales completaron la tarea exploratoria completa antes de sacarlos. Cada columna representa la media \pm el error estándar para 6 animales por condición de tratamiento. Los animales control no recibieron isquemia, los animales tratados con solución salina (SAL) recibieron isquemia pero no fármaco. Los animales que recibieron isquemia más tratamiento con 0,32-32 mg/kg de fármaco mostraron una protección del comportamiento significativa respecto a los cambios inducidos por la isquemia en el comportamiento de patrulla.

50

La figura 16 de referencia representa un gráfico de barras que muestra los efectos de dosis de pretratamiento del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre la densidad de neuronas en el hipocampo dorsal (CA-1) del jervo. Se pretrataron los jerbos con dosis de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona tal como se describió en las figuras anteriores y se permitió que se recuperaran de la lesión por

65

ES 2 313 714 T3

isquemia y reperusión durante 7 días antes de la anestesia y la fijación del tejido. Se congeló el tejido, se practicaron cortes y se tiñeron, se contaron los núcleos neuronales en zonas discretas de la región CA-1 del hipocampo. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar para 6 sujetos (se evaluó cada sujeto para un mínimo de 3 cortes consecutivos del hipocampo dorsal para detectar pérdida neuronal). El pretratamiento con 0,32-32 mg/kg del fármaco proporcionó una protección significativa respecto a la pérdida de neuronas inducida por la isquemia.

La figura 17 de referencia representa un gráfico de barras que muestra los efectos del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre la densidad neuronal en el hipocampo dorsal (CA-1) del jerbo. Los jerbos se pretrataron y postrataron con 3,2 mg/kg del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y se permitió que se recuperaran de la lesión por isquemia y reperusión durante 7 días antes de la anestesia y fijación del tejido. Se congeló el tejido, se practicaron cortes y se tiñeron, se contaron los núcleos neuronales en zonas discretas de la CA-1. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar para 6 sujetos (se evaluó cada sujeto para un mínimo de 3 cortes consecutivos del hipocampo dorsal para detectar pérdida neuronal). Tanto el pretratamiento como el postratamiento con 3,2 mg/kg de fármaco proporcionaron una protección significativa con respecto a la pérdida de neuronas inducida por la isquemia.

La figura 18 de referencia representa un gráfico de barras que muestra la inhibición del dolor inducido por formalina en ratones mediante 1, 5, 10, 20, 30 y 40 mg/kg del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal o bien DMSO (control de vehículo) o bien el fármaco en DMSO 30 minutos antes de la inyección subcutánea de 20 μ l de formalina al 5% en la superficie de la planta de la pata trasera. Entonces se observaron los ratones y se registró el tiempo que pasaron los ratones lamiendo la pata trasera inyectada en intervalos de cinco minutos durante los periodos de tiempo indicados. El tiempo que pasaron lamiendo la pata trasera inyectada es un indicador del dolor experimentado por el animal. Tal como se muestra en la figura 18, la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona inhibió el lamido inducido por formalina de una manera dependiente de la dosis indicando una eficacia antinociceptiva potente en este modelo animal de dolor crónico.

La figura 19 representa un gráfico de barras que muestra la inhibición del dolor inducido por formalina en ratones mediante 5, 10, 20 y 40 mg/kg de 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal o bien DMSO (control de vehículo) o bien el fármaco en DMSO 30 minutos antes de la inyección subcutánea de 20 ml de formalina al 5% en la superficie de la planta de la pata trasera. Entonces se observaron los ratones y se registró el tiempo que pasaron los ratones lamiendo la pata trasera inyectada en intervalos de cinco minutos durante los periodos de tiempo indicados. El tiempo que pasaron lamiendo la pata trasera inyectada es un indicador del dolor experimentado por el animal. Tal como se muestra en la figura 19, la 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona inhibió el lamido inducido por formalina de una manera dependiente de la dosis indicando una eficacia antinociceptiva potente en este modelo animal de dolor crónico.

Las figuras 20A y 20B representan gráficos de líneas que muestran la inhibición del dolor inducido por formalina en ratones mediante 1, 5, 10, 20 y 40 mg/kg de 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal o bien DMSO (control de vehículo) o bien el fármaco en DMSO 30 minutos antes de la inyección subcutánea de 20 ml de formalina al 5% en la superficie de la planta de la pata trasera. Entonces se observaron los ratones y se registró el tiempo que pasaron los ratones lamiendo la pata trasera inyectada en intervalos de cinco minutos durante los periodos de tiempo indicados. El tiempo que pasaron lamiendo la pata trasera inyectada es un indicador del dolor experimentado por el animal. Tal como se muestra en las figuras 20A y 20B, la 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona inhibió el lamido inducido por formalina de una manera dependiente de la dosis tanto en la fase temprana (0,5 minutos; figura 20A) de la respuesta de dolor (lamido) como en la fase tardía (15-50 minutos; figura 20B) de la respuesta de lamido de dolor indicando una eficacia antinociceptiva potente en este modelo animal de dolor crónico.

La figura 21 de referencia representa un diagrama que muestra las solubilidades del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, la sal de colina, la sal de monopotasio y la sal de dipotasio del mismo.

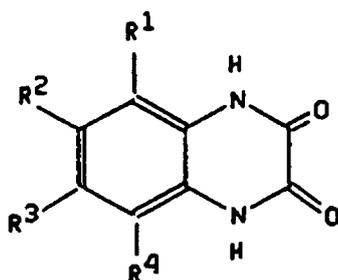
La figura 22A de referencia representa un gráfico que muestra la actividad sedante (pérdida del reflejo de enderezamiento) de los ratones a lo largo del tiempo tras la inyección i.p. del compuesto de referencia 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto número 1; véase la figura 22B), en comparación con el compuesto de referencia 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto número 2; véase la figura 22B; inactivo) y ketamina (compuesto número 3; véase la figura 22B).

Las figuras 23A y 23B representan gráficos de barras que muestran los efectos de diversas dosis de PCP, el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en ratas entrenadas para diferenciar 2 mg/kg de PCP de solución salina. La figura 23A muestra el grado de efectos de tipo PCP en el porcentaje medio de selección de palanca de PCP. La figura 23B muestra efectos sobre las tasas globales de respuesta. Los valores por encima de SAL, PCP y DMSO muestran los resultados de pruebas de control con solución salina, PCP 2 mg/kg y DMSO 0,5 ml/kg realizados antes de las pruebas de PCP, 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Los valores representan la media de seis ratas.

La figura 24 muestra un gráfico de barras que muestra la actividad locomotriz de ratones Swiss/Webster tras la inyección intraperitoneal de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en DMSO o MK801 en solución salina. Se inyectó a grupos de al menos seis ratones vehículo o dosis crecientes de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en DMSO o MK801 en solución salina. Entonces se registró la actividad locomotriz durante cuatro periodos de 15 minutos consecutivos. Se muestra la actividad locomotriz en el segundo intervalo de quince minutos.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere al uso de compuestos que tienen alta afinidad por el sitio de unión a glicina, que carecen de efectos secundarios de PCP y que atraviesan la barrera hematoencefálica a altos niveles para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de los estados patológicos mencionados anteriormente. Tales compuestos son 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas que son antagonistas competitivos sumamente selectivos del sitio de unión a glicina del receptor de NMDA. Las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas de la invención tienen la siguiente fórmula (I):



I

o un tautómero de la misma;

en la que R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son tal como se define en la reivindicación 1 ó 3.

Los grupos alquilo C_{1-6} típicos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, neopentilo, hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo.

Los grupos halógeno típicos incluyen flúor, cloro, bromo y yodo.

Los grupos haloalquilo típicos incluyen grupos alquilo C_{1-6} sustituidos con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo, por ejemplo grupos fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, pentafluoroetilo, 1,1-difluoroetilo y triclorometilo.

Los grupos amino típicos incluyen $-NH_2$, NHR^9 y $-NR^9R^{10}$, en los que R^9 y R^{10} son uno de los grupos alquilo C_{1-6} mencionados anteriormente.

Los grupos amino típicos incluyen un grupo amino sustituido con un grupo acilo C_{2-6} , por ejemplo grupos acetilo, propionilo, butanoilo, pentanoilo y hexanoilo.

Las quinoxalin-2,3-dionas particularmente preferidas de la presente invención incluyen 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-difluoro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6-cloro-5-nitro-7-bromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dicloro-5-bromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6-cloro-5-nitro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 5-bromo-6,7-difluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 5,6,7,8-tetrafluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 5,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 5-bromo-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 4-carboximetil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 5-amino-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 5-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 7-cloro-6-nitro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 5-amino-7-cloro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 7-cloro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 7-bromo-6-nitro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6-amino-7-bromo-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 7-bromo-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 7-fluoro-6-nitro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6-amino-7-fluoro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 7-fluoro-6-nitro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dicloro-5-hidroxilamino-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 6,7-dibromo-5-hidroxilamino-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona.

Compuestos especialmente preferidos son 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-difluoro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6-cloro-5-nitro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 7-bromo-6-cloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. La 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-

ES 2 313 714 T3

2,3-diona previenen la muerte de células nerviosas inducida por la isquemia en el modelo de isquemia global del
jerbo tras la administración i.p. La 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-di-
hidroquinoxalin-2,3-diona y el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona son
potentes anticonvulsivos en al menos dos de los tres modelos animales tras la administración i.p. del compuesto de
5 referencia. Se encontró también que la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dicloro-5-nitro-
1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona presentaban también eficacia
analgésica tras la administración i.p. en un animal con dolor crónico (inducido por formalina).

Los compuestos de la presente invención muestran baja reactividad cruzada con receptores de cainato, AMPA y
10 quisqualato y los sitios de unión a glutamato y PCP de los receptores de NMDA y por tanto son distintos de cualquiera
de las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas descritas previamente, en particular, 6-ciano-7-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-
2,3-diona y 6,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona tal como se dan a conocer en la patente estadounidense nú-
mero 4.975.430.

Los compuestos de la presente invención son activos en el tratamiento o la prevención de la pérdida neuronal,
15 enfermedades neurodegenerativas, dolor crónico, son activos como anticonvulsivos y en la inducción de anestesia sin
efectos secundarios perjudiciales producidos por la unión no selectiva con otros receptores, particularmente receptores
de cainato, AMPA y quisqualato y los receptores de glutamato y PCP asociados con el receptor de NMDA. Además,
los compuestos de la presente invención son eficaces en el tratamiento o la prevención de consecuencias adversas de
20 la hiperactividad de los aminoácidos excitadores, por ejemplo, los que están implicados en el sistema del receptor de
NMDA, bloqueando los receptores de glicina e impidiendo que los canales catiónicos activados por ligando se abran
y permitan una entrada excesiva de Ca^{++} en las neuronas, tal como se produce durante la isquemia.

Las enfermedades neurodegenerativas que pueden tratarse con los compuestos de la presente invención incluyen
25 las seleccionadas del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de
Huntington y síndrome de Down.

Los compuestos de la presente invención encuentran utilidad particular en el tratamiento o la prevención de la
pérdida neuronal asociada con accidentes cerebrovasculares múltiples que dan lugar a demencia. Tras haber diagnos-
30 ticado a un paciente que padece un accidente cerebrovascular, pueden administrarse los compuestos de la presente
invención para mejorar la isquemia inmediata y prevenir el daño neuronal adicional que puede producirse a partir de
accidentes cerebrovasculares recurrentes.

Además, los compuestos de la presente invención pueden atravesar la barrera hematoencefálica, a diferencia de
35 la 6-ciano-7-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y la 6,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y otras 1,4-di-
hidroquinoxalin-2,3-dionas 6,7-disustituidas que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica tras la administración
i.p. (véase Turski, L. *et al.*, J. Pharm. Exp. Ther. 260: 742-747 (1992)). Véase también Sheardown *et al.*, Eur. J. Phar-
macol. 174: 197-204 (1989), que dan a conocer que la 5,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dinitro-1,4-
dihidroquinoxalin-2,3-diona y 6-ciano-7-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona tienen poco acceso al sistema nervio-
40 so central.

Para que un compuesto comience a mostrar eficacia *in vivo* y, por tanto, la capacidad de atravesar la barrera hema-
toencefálica, el compuesto debe presentar una DE_{50} inferior a 100 mg/kg de peso corporal del animal. Preferiblemente,
los compuestos de la presente invención presentan una DE_{50} inferior a 20 mg/kg y, más preferiblemente; inferior a 10
45 mg/kg.

Los compuestos de la invención encuentran utilidad particular en el tratamiento o la prevención de consecuencias
nerológicas adversas de la cirugía. Por ejemplo, la cirugía de revascularización coronaria requiere el uso de máquinas
50 de circulación extracorpórea que tienden a introducir burbujas de aire en el sistema circulatorio que pueden depositarse
en el cerebro. La presencia de tales burbujas de aire priva de oxígeno al tejido neuronal, dando como resultado anoxia
e isquemia. La administración pre o posquirúrgica de las 1,4-dihidroquinoxalinas de la presente invención tratará o
prevendrá la isquemia resultante. En una realización preferida, los compuestos de la invención van a administrarse a
pacientes que se someten a cirugía de derivación cardiopulmonar o cirugía de endoarterioectomía carotídea.

Los compuestos de la presente invención también encuentran utilidad en el tratamiento o la prevención del dolor
55 crónico. Tal dolor crónico puede ser el resultado de cirugía, traumatismos, cefalea, artritis u otra enfermedad dege-
nerativa. Los compuestos de la presente invención encuentran utilidad particular en el tratamiento del dolor fantasma
que resulta de la amputación de una extremidad. Además del tratamiento del dolor, los compuestos de la presente
invención también son útiles en la inducción de anestesia, o bien anestesia general o bien local, por ejemplo, durante
60 la cirugía.

Se ha sintetizado un total de más de 30 derivados de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y se han sometido a prueba
para determinar la actividad antagonista de glicina *in vivo*. De entre estos fármacos novedosos, se han identificado
65 varios compuestos con una afinidad particularmente alta por los receptores de glicina/NMDA. A partir de la inspec-
ción de la estructura de los análogos más potentes, parece que la combinación de un grupo NO_2 con dos átomos de
halógeno, por ejemplo cloro o bromo; o con un grupo Cl y un grupo CF_3 en el sistema de anillo de la 1,4-dihidroqui-
noxalin-2,3-diona, proporciona antagonistas de glicina particularmente potentes. De hecho, la 6,7-dibromo-5-nitro-
1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y la 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, con afinidades de 6 nM y 8

ES 2 313 714 T3

nM, respectivamente, por el sitio de unión a glicina, son los antagonistas de glicina/NMDA más potentes descubiertos hasta la fecha. Es de interés que el grupo NO₂ en el compuesto 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona ha aumentado, en varios cientos de veces, la afinidad por el receptor de glicina de su compuesto original, la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (DCQX), que otros han descrito como un antagonista de glicina potente y selectivo (Yoneda y Ogita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:841-849 (1989)). De manera sorprendente, es posible reducir el grupo nitro de la 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y la 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona para obtener 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas sustituidas con amino que también tienen alta afinidad de unión por el sitio de unión a glicina.

Debido a que se sabe que las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas, especialmente CNQX y DNQX, son potentes antagonistas de AMPA y cainato, se sometieron a prueba los compuestos de la presente invención en ensayos de unión a AMPA y cainato para determinar la reactividad cruzada en estos receptores que no son de NMDA. Se encontró que los antagonistas de glicina potentes no tenían reactividad cruzada significativa en los sitios de AMPA y cainato o sólo reactividad cruzada minoritaria. Por tanto, los compuestos de la presente invención son antagonistas de glicina potentes pero presentan poca o ninguna reactividad cruzada en los sitios de AMPA y cainato.

Preferiblemente, los compuestos de la invención presentan una afinidad de unión al sitio de unión a glicina de K_i = 10 nM o inferior, más preferiblemente, 1 nM o inferior y más preferiblemente, 500 nM o inferior y más preferiblemente, 100 nM o inferior y lo más preferiblemente, 10 nM o inferior. También preferiblemente son compuestos que presentan unión en los sitios de AMPA y cainato no inferior a K_i = 1 nM y, más preferiblemente, no inferior a 10 nM.

Entonces se sometieron a prueba los antagonistas de glicina novedosos para determinar la actividad *in vivo* tras la inyección intraperitoneal usando varias pruebas anticonvulsivas en ratones (modelo de convulsión audiogénica en ratones DBA-2, convulsiones inducidas por pentilentetrazol en ratones, muerte inducida por NMDA en ratones). Todos los compuestos sometidos a prueba mostraron actividad en uno o más de los tres modelos. La 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto n° 1, tabla IV) era el más potente de los cinco, particularmente en el modelo de convulsión audiogénica (DE₅₀ = 5 mg/kg) y el modelo de muerte inducida por NMDA (DE₅₀ = 20 mg/kg). La 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto n° 13, tabla IV) también era muy potente, particularmente en el modelo de convulsión audiogénica (DE₅₀ = 10 mg/kg). Sin embargo, estos dos compuestos presentaron diferente propensión a producir efectos secundarios de ataxia tal como se determinó mediante la prueba de ataxia con Rotorod en el ratón. En particular, la 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona presentó una TD₅₀ = 200 mg/kg en esta prueba. Por tanto, este compuesto es eficaz en la prevención de las convulsiones a dosis que son muy inferiores a las que producen efectos secundarios de ataxia. Esto es en comparación con una TD₅₀ = 27 mg/kg en la prueba de ataxia con Rotorod para la 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona.

Por tanto, los compuestos de la presente invención presentan efectos secundarios de ataxia en la prueba de ataxia con Rotorod a niveles de dosificación superiores a aproximadamente 100 mg/kg, más preferiblemente, superiores a aproximadamente 200 mg/kg.

También se sometieron a prueba dos compuestos (n° 1 (tabla IV) y el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto n° 2 (tabla IV)) para determinar la eficacia neuroprotectora tras la inyección intraperitoneal en el modelo de isquemia global de jerbo y se encontró que tenían eficacia neuroprotectora potente en este paradigma. También se sometieron a prueba los mismos compuestos en pruebas de discriminación de fármacos en ratas entrenadas para diferenciar PCP de solución salina. Ninguno de los dos compuestos se generalizó a PCP a ninguna dosis en estos estudios de discriminación de fármacos. Además, ninguno de los compuestos produjo una excitación del comportamiento en pruebas de actividad locomotriz en el ratón. Los resultados de estos estudios sugieren que los antagonistas de glicina novedosos de la presente invención no muestran los efectos secundarios de comportamiento de tipo PCP que son comunes para bloqueantes del canal de NMDA tales como MK801 y PCP o para antagonistas competitivos de NMDA tales como CGS19755.

Es importante que los antagonistas de glicina novedosos mostraban actividad potente *in vivo* tras la inyección intraperitoneal, lo que sugiere que estos compuestos pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Otros investigadores han notificado que los análogos de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona CNQX y DNQX no pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Turski, L., *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.* 260:742-747 (1992)), un hallazgo que han confirmado los inventores. Aparentemente, las alteraciones en los sustituyentes del anillo de benceno de las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas no sólo dan como resultado un aumento drástico en la afinidad por el receptor de glicina y una pérdida en la afinidad por el receptor de AMPA/cainato, sino que también pueden producir compuestos con una capacidad bastante satisfactoria para atravesar la barrera hematoencefálica (véase Turski, L. *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.* 260: 742-747 (1992)).

Antes de la presente invención, se creía que uno de los farmacóforos primarios para el antagonismo de la glicina era el grupo amida en la 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona produciendo una mejora de la potencia con la sustitución de sustituyentes extractores de electrones en el anillo aromático, disminuyendo así la pK_a del hidrógeno de amida (Gray *et al.*, *J. Med. Chem.* 34:1283 (1991); Leeson, P.D., *et al.*, *J. Med. Chem.* 34:1243 (1991)). Aunque los estudios descritos en esta invención han confirmado generalmente esta propuesta, se ha descubierto ahora que las posiciones relativas de los sustituyentes en el anillo así como la identidad de los grupos extractores de electrones son también importantes. La presente invención se refiere a este descubrimiento.

ES 2 313 714 T3

Se ha descubierto adicionalmente que uno o ambos de los hidrógenos de amida pueden sustituirse por grupos amina, hidroxilo, carboxialquilo y carboxiaralquilo y que los compuestos resultantes conservan una unión alta al receptor de glicina.

5 El antagonista novedoso más potente que es parte de esta invención en la 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona ($K_i = 6$ nM). El segundo antagonista más potente es la 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona ($K_i = 8$ nM). Otros antagonistas potentes incluyen una mezcla de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona nitrada (los compuestos de referencia 3x y 3y, tabla I y los compuestos de referencia n° 3 y 4, tabla IV). Otro antagonista potente sintetizado en la serie de 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona es el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (3h, tabla I y el compuesto n° 2, tabla IV). Otro derivado con potencia apreciable pero muy inferior es el compuesto de referencia 6-nitro-7-(trifluorometil)-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (3k, tabla I). La colocación y el tipo del grupo extractor de electrones en el anillo parecen ser importantes, ya que las sustituciones en las posiciones 5 y 7 del anillo de 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona parecen mejorar la potencia del sitio de unión a glicina. La sustitución en la posición 6 con grupos ionizables tales como sulfonatos, sulfonamidas primarias (31-n, tabla I) y ácidos carboxílicos destruye la capacidad de unión de los compuestos al receptor de glicina. Ni la alquilación de la sulfonamida (30-p, tabla I) ni la metilación del ácido conducen a un aumento de la actividad. La metilación del nitrógeno de amida en el anillo de quinoxalina también destruye la capacidad de unión del compuesto, tal como se evidencia mediante la carencia de actividad de la 6,7-dinitro-N-metil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona. La síntesis del análogo de piridina (ejemplo 26) y un análogo de pteridina (ejemplo 27) de 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona produjo compuestos inactivos.

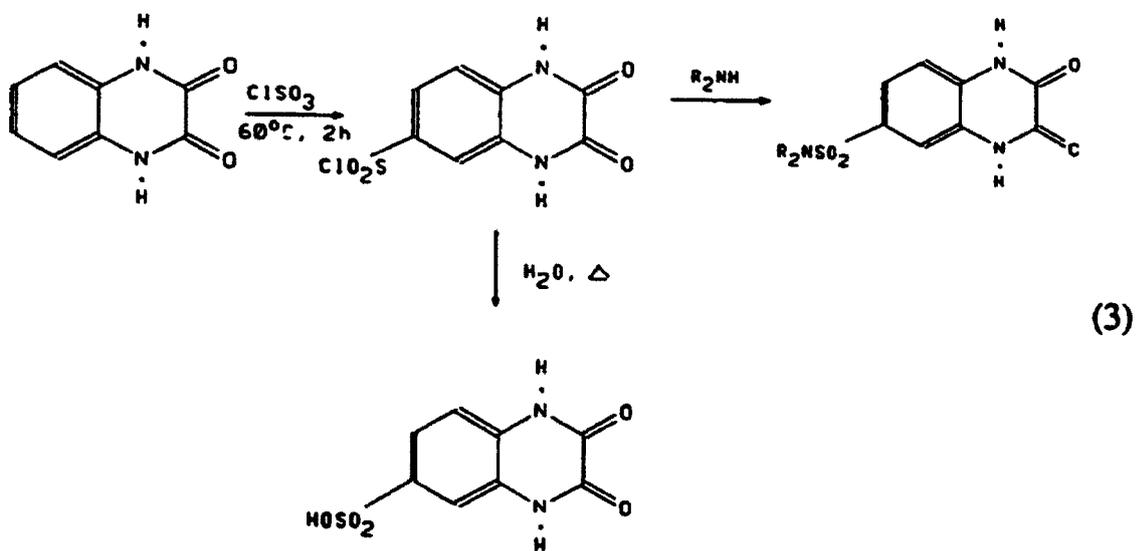
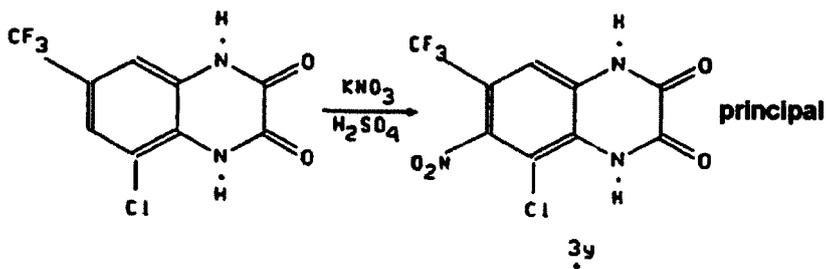
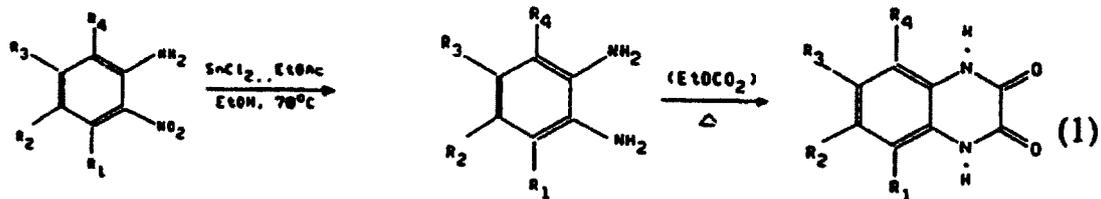
Otro aspecto importante de la presente invención se refiere al descubrimiento de que las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas sustituidas con amino también tienen alta afinidad de unión al sitio de unión a glicina. Esto era inesperado en vista del hecho de que los grupos amino con donadores de electrones y la expectativa de que los grupos extractores de electrones son importantes para una alta afinidad de unión.

Los compuestos sintetizados para someterlos a prueba como antagonistas de glicina potenciales se resumen a continuación (tabla I). La mayoría estaban disponibles mediante condensación simple de oxalato de dietilo con el diaminobenceno correspondiente según Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc. 1171 (1962). También se descubrió que las 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindionas pueden prepararse fácilmente con alto rendimiento calentando ácido oxálico y la *o*-diamina correspondiente hasta de 100 a 140°C durante de 1 a 10 h en presencia de un ácido mineral fuerte tal como HCl, H₂SO₄, H₃PO₄. En una realización preferida, se calientan ácido oxálico y la *o*-diamina hasta 125°C en HCl 2 N durante 2,5 horas para dar la 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona en alto rendimiento. La presente invención también da a conocer este procedimiento mejorado para preparar 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindionas.

Los *o*-diaminobencenos de partida o bien están directamente disponibles del fabricante o bien se accedió a ellos fácilmente mediante la reducción de la *o*-nitroanilina correspondiente (esquema I, eq. 1), según Bellamy, F.D. y Ou, K., Tetr. Lett. 25:839 (1984). Se realizaron nitraciones mediante tratamiento de la 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona con KNO₃ en H₂O₄ conc. (esquema III, eq. 2). Se prepararon las 5-halo-6,7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindionas mediante el tratamiento de la 4,5-difluoro-2-nitroanilina con N-bromosuccinimida o N-clorosuccinimida (Mitchell, R.H., *et al.*, J. Org. Chem. 44:4733 (1979)), seguido por reducción y condensación con oxalato de dietilo. Se sometieron a prueba los compuestos para determinar la actividad antagonista de glicina potencial observando la inhibición de la unión de [³H]-MK-801 estimulado con glicina 1 μM en homogeneizados de membrana de cerebro de rata o cobaya. Cuanto más potente sea el antagonista de glicina, menos [³H]-MK-801 puede unirse dado que el sitio de unión a [³H]-MK801 (receptor de PCP) es accesible sólo tras la apertura del canal iónico mediante el glutamato y la glicina (Fletcher, E.L., *et al.*, en Glycine Neurotransmission, Otterson, P., *et al.* (eds.), John Wiley y Sons (1990); Johnson, J.W., *et al.*, Nature 325:529 (1987)).

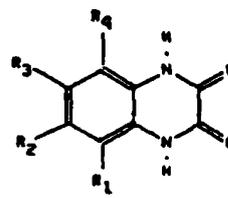
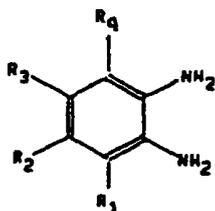
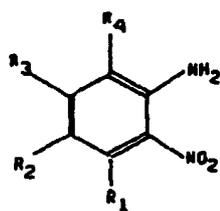
(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema I



ES 2 313 714 T3

TABLE 1



1

2

3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

	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

ES 2 313 714 T3

	v	Br	H	Br	H
	w	Cl	Cl	Cl	Cl
5	3a	H	F	H	H
	b	H	CN	H	H
10	c	H	CF ₃	H	H
	d	H	F	F	H
15	e	F	F	F	F
	f	Br	H	F	H
	g	H	Cl	F	H
20	h	Cl	H	CF ₃	H
	i	Br	H	CF ₃	H
25	j	H	F	NO ₂	H
	k	H	CF ₃	NO ₂	H
	l	H	SOCl ₂	H	H
30	m	H	SO ₂ H	H	H
	n	H	SO ₂ NH ₂	H	H
35	o	H	SO ₂ N-n-Pr	H	H
	p	H	SO ₂ N(CH ₃) ₂	H	H
40	3q	Cl	H	F	H
	r	Cl	F	F	H
	s	Br	F	F	H
45	t	H	Br	F	H
	u	Cl	H	Cl	H
50	v	Br	H	Br	H
	w	Cl	Cl	Cl	Cl
	y	Cl	H	CF ₃	NO ₂
55	x	Cl	NO ₂	CF ₃	H
	z	H	Br	Br	NO ₂
60					

Los sulfonatos y derivados se prepararon mediante tratamiento de la 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona original con ácido clorosulfónico y tratamiento posterior con la amina deseada para formar la sulfonamida (esquema I, eq. 3). Véase Mitchell *et al.*, *J. Org. Chem.* 44:4733 (1979). Se preparó la 5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona mediante tratamiento de la 4-fluoro-2-nitroanilina con N-bromosuccinimida seguido por reducción y condensación con oxalato de dietilo.

ES 2 313 714 T3

La actividad ansiolítica de cualquier compuesto particular de la presente invención puede determinarse mediante el uso de cualquiera de los modelos animales reconocidos para la ansiedad. Se describe un modelo preferido por Jones, B.J. *et al.*, Br. J. Pharmacol. 93: 985-993 (1988). Este modelo implica administrar el compuesto en cuestión a ratones que tienen un alto nivel basal de ansiedad. La prueba se basa en el hallazgo de que tales ratones encuentran aversivo que se les saque de un entorno de hábitat oscuro en una habitación de prueba oscura y se les coloque en una zona que está pintada de blanco e iluminada de manera intensa. La caja de prueba tiene dos compartimentos, uno blanco e iluminado de manera intensa y otro negro y no iluminado. El ratón tiene acceso a ambos compartimentos mediante una abertura a nivel del suelo en la mampara entre los dos compartimentos. Los ratones se colocan en el centro de la zona iluminada de manera intensa. Tras ubicar la abertura en la zona oscura, los ratones son libres de pasar por debajo y hacia delante entre los dos compartimentos. Los ratones control tienden a pasar una mayor proporción de tiempo en el compartimento oscuro. Cuando se les administra un agente ansiolítico, los ratones pasan más tiempo explorando el compartimento iluminado de manera más intensa más novedoso y presentan una latencia retardada a moverse hacia el compartimento oscuro. Además, los ratones tratados con el agente ansiolítico presentan más comportamiento en el compartimento blanco, tal como se mide mediante cruces de líneas y erguimientos exploratorios. Dado que los ratones pueden habituarse a esta situación de prueba, deben usarse siempre en la prueba ratones no sometidos a prueba anteriormente. Pueden medirse cinco parámetros: latencia a entrar en el compartimento oscuro, el tiempo pasado en cada zona, el número de transiciones entre compartimentos, el número de líneas cruzadas en cada experimento y el número de erguimientos en cada compartimento. Se espera que la administración de los compuestos de como resultado que los ratones pasen más tiempo en la zona iluminada de manera intensa, más grande de la cámara de prueba.

En el modelo de exploración de luz/oscuridad, puede identificarse la actividad ansiolítica de un agente supuesto mediante el aumento del número de cruces de líneas y erguimientos en el compartimento iluminado a expensas del número de cruces de líneas y erguimientos en el compartimento oscuro, en comparación con ratones control.

Un segundo modelo animal preferido es la prueba de interacción social de la rata descrito por Jones, B.J. *et al.*, citado anteriormente, en el que se cuantifica el tiempo que pasan dos ratones en interacción social. La actividad ansiolítica de un agente supuesto puede identificarse mediante el aumento en el tiempo que dos parejas de ratas macho pasan en interacción social activa (el 90% de los comportamientos son de naturaleza investigadora). Pueden manipularse tanto el nivel de luz como el de familiaridad de la área de prueba. Las ratas a las que no se les administró fármaco muestran el nivel más alto de interacción social cuando la área de prueba es familiar y está iluminada mediante luz baja. La interacción social disminuye si la área no es familiar para las ratas o está iluminada mediante luz brillante. Los agentes ansiolíticos previenen esta disminución. El nivel global de actividad motora también puede medirse para permitir la detección de efectos farmacológicos específicos para comportamientos sociales.

La presente invención se refiere al uso de los compuestos dados a conocer en el presente documento en la fabricación de sedantes-hipnóticos. Se encontró que el antagonista de glicina/NMDA 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia) tiene actividad sedante/hipnótica tras la inyección i.v. en ratones. En cambio, la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia) carece completamente de actividad sedante-hipnótica (véase la figura 22A). La 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es considerablemente más potente y de larga duración como sedante-hipnótico que la ketamina, un bloqueante de canal de NMDA usado como anestésico en seres humanos.

La afinidad de unión de la 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona ($K_i=0,9 \mu\text{M}$) en el receptor de glicina no es sustancialmente diferente de la de la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona ($K_i=0,33 \mu\text{M}$). Además, la afinidad de unión a AMPA y cainato de la 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no son sustancialmente diferentes. Por tanto, es probable que la diferencia en la actividad sedante/hipnótica entre los dos compuestos se deba al hecho de que la 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona penetra fácilmente la barrera hematoencefálica, mientras que la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no. También se ha observado la misma diferencia en la eficacia *in vivo* entre estos dos compuestos en las pruebas de eficacia anticonvulsiva.

También se dan a conocer composiciones en las que los compuestos de la presente invención están contenidos en una cantidad que es eficaz para lograr su fin deseado. Mientras que las necesidades individuales pueden variar, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades eficaces de cada componente está dentro de la experiencia de la técnica. Normalmente, los compuestos pueden administrarse a mamíferos, por ejemplo seres humanos, por vía oral a una dosis de 0,0025 a 50 mg/kg, o una cantidad equivalente de la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, por día del peso corporal del mamífero que está tratándose para trastornos de ansiedad, por ejemplo, trastorno de ansiedad generalizada, trastornos fóbicos, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de pánico y trastornos de estrés postraumático. Preferiblemente, van a administrarse por vía oral de 0,01 a 10 mg/kg para tratar o prevenir tales trastornos. Para inyección intramuscular, generalmente la dosis es aproximadamente la mitad de la dosis oral. Por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de la ansiedad, una dosis intramuscular adecuada debería ser de 0,0025 a 15 mg/kg, y lo más preferiblemente, desde 0,01 hasta 10 mg/kg.

En el tratamiento o prevención de la pérdida neuronal en la isquemia, traumatismos de la médula espinal y cerebro, hipoxia, hipoglucemia y cirugía, así como para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y síndrome de Down, o para tratar una enfermedad en la que la fisiopatología del trastorno implica hiperactividad de los aminoácidos excitadores o neurotoxicidad relacionada con el canal iónico del receptor de NMDA, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender los compuestos de la presente invención a un nivel de dosis unitaria de 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal, o una cantidad equivalente de la

ES 2 313 714 T3

sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un régimen de 1-4 veces al día. Cuando se usan para tratar dolor crónico o para inducir anestesia, los compuestos de la invención pueden administrarse a un nivel de dosificación unitaria de desde 0,01 hasta 50 mg/kg de peso corporal, o una cantidad equivalente de la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en un régimen de 1-4 veces al día. Por supuesto, se entiende que el nivel de tratamiento exacto dependerá de la historia clínica del animal, por ejemplo el ser humano, que se trata. El nivel de tratamiento preciso puede determinarlo un experto habitual en la técnica sin experimentación excesiva.

La dosis oral unitaria puede comprender desde 0,01 hasta 50 mg, preferiblemente de 0,1 a 10 mg del compuesto. La dosis unitaria puede administrarse una o más veces al día como uno o más comprimidos que contienen cada uno desde 0,1 hasta 10, de manera conveniente de 0,25 a 50 mg del compuesto o sus solvatos.

Además de administrar el compuesto como un producto químico sin procesar, los compuestos de la invención pueden administrarse como parte de una preparación farmacéutica que contiene vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y productos auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Preferiblemente, las preparaciones, particularmente las preparaciones que pueden administrarse por vía oral y que pueden usarse para el tipo preferido de administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar y cápsulas, y también preparaciones que pueden administrarse por vía rectal, tales como supositorios, así como disoluciones adecuadas para administración mediante inyección o por vía oral, contienen desde el 0,01 hasta el 99 por ciento, preferiblemente desde el 0,25 hasta el 75 por ciento del/de los compuesto(s) activo(s), junto con el excipiente.

También se incluye dentro del alcance de la presente invención el uso de sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de los estados patológicos reivindicados. Las sales de adición de ácido se forman mezclando una disolución del compuesto con una disolución de un ácido no tóxico farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido fosfórico y ácido oxálico. Por ejemplo, se forman sales básicas mezclando una disolución de la 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona con una disolución de una base no tóxica farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio y carbonato de sodio.

Sales preferidas de las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas de la invención son las sales sumamente solubles que comprenden un contraión amonio C_{3-24} , en las que uno de los grupos alquilo puede estar sustituido con un grupo hidroxilo. La mayoría de las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas son sumamente insolubles en disolución acuosa. Por tanto, la administración i.v. de las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas está limitada por la insolubilidad relativa del principio activo. Pueden prepararse las sales de amonio sumamente solubles, por ejemplo, mediante disolución de la 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en una disolución de un equivalente molar del hidróxido de amonio o compuesto de amino correspondiente.

Los contraiones amonio pueden ser cationes de amonio cuaternario o aminas mono, di o trisustituidas que forman sales de amonio protonadas cuando se mezclan con una 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en disolución.

La sal de monocolina de las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas tiene un pH de aproximadamente 7,8-9,8, dependiendo de la 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona usada. Alternativamente, la 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona puede disolverse en primer lugar en una disolución que contiene 2 equivalentes molares del hidróxido de amonio. La sal de dicolina puede aislarse o el pH de la disolución puede ajustarse hasta aproximadamente 7,8-9,8 con 1 equivalente de ácido acético.

La sal de amonio de las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas puede aislarse fácilmente en forma pura liofilizando la disolución para dar un polvo seco que es sumamente soluble en agua. Hasta 90 mg/ml o más de la sal de monocolina de una 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona se disolverán en agua para dar una disolución clara. La sal también puede disolverse en una disolución de glucosa isotónica adecuada para inyección i.v.

Los ejemplos de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas que pueden solubilizarse según la presente invención incluyen las dadas a conocer en el presente documento así como las dadas a conocer en las patentes estadounidenses número 5.109.001, 5.081.123, 5.079.250, 5.075.306, 5.057.516, 5.026.704, 5.061.706, 4.977.155, 4.975.430, 4.889.855, 4.812.458, 3.992.378, 3.962.440, 4.812.458, 4.659.713, 4.948.794, la publicación de solicitud internacional número WO91/13878, Yoneda y Ogita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:841-849 (1989), Kleckner y Dingleline, *Mol. Pharm.* 36:430-436 (1989), Rao, T.S. *et al.*, *Neuropharmacology* 29:1031-1035 (1990), Pellegrini-Giampietro, D.E. *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 98:1281-1286 (1989), Ogita y Yoneda, *J. Neurochem.* 54:699-702 (1990), Kessler, M. *et al.*, *Brain Res.* 489:377-382 (1989), publicación de solicitud de patente europea número 0 377 112, 0 315 959 y 260,467, Lester, R.A. *et al.*, *Mol. Pharm.* 35:565-570 (1989), Patel, J. *et al.*, *J. Neurochem.* 55:114-121 (1990), Horner, L. *et al.*, *Chem. Abstracts* 48:2692 (1953), Cheeseman, G.W.H., *J. Chem. Soc.*: 1170-1176 (1962), Honore, T. *et al.*, *Science* 241:701-703 (1988) y Sheardown, M.J. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 174:197-204 (1989), las descripciones de los cuales se incorporan completamente como referencia en el presente documento.

Los ejemplos de hidróxidos de amonio que pueden usarse para preparar las sales de amonio de la presente invención incluyen cualquier hidróxido de amonio de tetraalquilo C_{1-6} , por ejemplo hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio, hidróxido de tetrabutilamonio, hidróxido de tetrapentilamonio, hidróxido de tetrahexilamonio, así

ES 2 313 714 T3

como cualquier hidróxido de amonio de trialquil C₁₋₆-alcanol C₁₋₆, por ejemplo hidróxido de colina, hidróxido de (3-hidroxiopropil)trimetil-amonio, hidróxido de (4-hidroxibutil)trimetilamonio, hidróxido de (2-hidroxietyl)trietilamonio, hidróxido de (2-hidroxietyl)tripropilamonio e hidróxido de (2-hidroxietyl)tributilamonio. Preferiblemente, el hidróxido de amonio es hidróxido de colina. Además, puede emplearse cualquier hidróxido de aralquil C₆₋₁₂-trialquil C₁₋₆-amonio, por ejemplo hidróxido de benciltrimetilamonio.

Los ejemplos de compuestos de amino que pueden usarse para preparar sales de las 1,4-quinoxalin-2,3-dionas incluyen, pero no se limitan a etilendiamina, dietilentriamina, N-metiletanolamina, di-(2-etanol)amina, tri-(2-etanol)amina, espermidina, espermina y aminocarbhidratos tales como glucosamina, N-metil-glucamina, galactosamina, manosamina, xilosamina, celobiosamina y maltosamina. Otros compuestos de amino que pueden usarse para preparar sales de amonio de las 1,4-dihidroquinoxalina-2,3-dionas de la presente invención incluyen mono-N-, di-(N,N y N,N'), tri-(N,N,N') y tetra-(N,N,N',N') alquil C₁₋₆-guanidinas así como biguanidina, biguanidinas polialquil C₁₋₆-sustituidas, amidina, arginina, N-alquil C₁₋₆-amidinas, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), tris(hidroximetil)aminometano (Tris, trometamina) y bis-tris-propano.

Tal como se muestra en la figura 21, cuando se prepara la sal de monopotasio del compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, es insoluble en agua. Sin embargo, la sal de dipotasio de la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es soluble en agua, pero requiere la adición de 4 equivalentes de KOH para dar una disolución que tiene un pH de 12,7. La 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona permanecerá soluble cuando el pH se disminuye hasta 11,9 mediante la adición de un equivalente de ácido acético. Sin embargo, la adición de un segundo equivalente de ácido acético produce que se forme un precipitado. En el tiempo en el que el pH alcanza 11, se completa la precipitación. Se ha descubierto inesperadamente que la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona se disuelve fácilmente en sólo 1 equivalente de hidróxido de colina. Cuando se añade ácido acético, no comienza a formarse un precipitado hasta que el pH alcanza aproximadamente 9,2. De manera similar la 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona puede disolverse en 1 equivalente de hidróxido de colina en agua. El pH puede ajustarse hasta aproximadamente 8 sin aparición de un precipitado. La sal de monocolina seca puede aislarse en forma pura, por ejemplo, mediante liofilización de una disolución acuosa, y es soluble a concentraciones muy altas (al menos de 90 mg/ml). Por tanto, este aspecto de la invención es un gran avance en la técnica ya que permite la preparación de disoluciones acuosas concentradas de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas para administración intravenosa.

Algunos de los contraiones amonio útiles para solubilizar 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas pueden mostrar toxicidad tras la administración i.v., por ejemplo, hidróxido de tetrametilamonio e hidróxido de tetraetilamonio. Se ha descubierto que muchas 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas pueden solubilizarse fácilmente en disoluciones 0,05 M-0,5 M de tris(hidroximetil)amino-metano (Tris, trometamina USP). La trometamina es prácticamente no tóxica cuando se administra por vía intravenosa en seres humanos. Por tanto, una disolución en trometamina de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas es sumamente útil para la administración i.v. a seres humanos y supera el obstáculo principal para lograr una disolución de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas para uso i.v. en seres humanos. La presente invención se refiere en parte a este descubrimiento. Como alternativa a la trometamina, puede usarse bis-tris-propano (1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]-propano), un análogo de trometamina que también muestra baja toxicidad en mamíferos. El bis-tris-propano tiene una pK superior a la trometamina y por tanto es útil para disolver algunas 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas que no son fácilmente solubles en trometamina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a cualquier animal que puede experimentar los efectos beneficiosos de los compuestos de la invención. En primer lugar entre tales animales están los seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier medio que logre su fin deseado. Por ejemplo, la administración puede ser mediante las vías parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, bucal u ocular. Alternativa o simultáneamente, la administración puede ser mediante la vía oral. La dosificación administrada dependerá de la edad, salud y peso del receptor, el tipo de tratamiento simultáneo, si hay alguno, la frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

Cuando las composiciones de la invención se administran por vía ocular, puede lograrse o bien administración local o bien sistémica. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden administrarse en forma de gotas oculares que son sustancialmente isotónicas con el líquido lagrimal para lograr la administración sistémica. Preferiblemente, tales composiciones comprenderán también un agente de mejora de la permeación que ayuda a la absorción sistémica de los compuestos de la presente invención. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.182.258. Alternativamente, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía ocular para tratar o prevenir la degeneración del nervio óptico. En esta realización, los compuestos de la presente invención se administran en forma de gotas oculares, tal como se dio a conocer anteriormente, o pueden inyectarse en las proximidades del nervio óptico. Como alternativa, pueden emplearse implantes oculares finos que liberan lentamente los compuestos de la presente invención.

Además de los compuestos farmacológicamente activos, las nuevas preparaciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y productos auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos para dar preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Preferiblemente, las preparaciones, particularmente las preparaciones que pueden administrarse por vía oral y que pueden usarse

ES 2 313 714 T3

para el tipo preferido de administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar y cápsulas, y también preparaciones que pueden administrarse por vía rectal, tales como supositorios, así como disoluciones adecuadas para administración mediante inyección o por vía oral, están presentes a una concentración de desde el 0,01 hasta el 99 por ciento, junto con el excipiente.

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican de una manera que se conoce por sí misma, por ejemplo, por medio de procedimientos de mezclado, granulación, preparación de comprimidos recubiertos de azúcar, disolución o liofilización convencionales. Por tanto, las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir productos auxiliares adecuados, si se desea o es necesario, para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar.

Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como sacáridos, por ejemplo lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo fosfato de tricalcio o hidrogenofosfato de calcio, así como aglutinantes tales como pasta de almidón, usando, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes tales como los almidones mencionados anteriormente y también carboximetilalmidón, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Los productos auxiliares son, sobre todo, agentes reguladores del flujo y lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, tales como estearato de magnesio o estearato de calcio, y/o polietilenglicol. Los núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar se proporcionan con recubrimientos adecuados que, si se desea, son resistentes a los jugos gástricos. Para este fin, pueden usarse disoluciones concentradas de sacárido, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Con el fin de producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos, se usan disoluciones de preparaciones de celulosa adecuadas tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos recubiertos de azúcar o comprimidos, por ejemplo, para la identificación o con el fin de caracterizar combinaciones de dosis de compuesto activo.

Otras preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras compuestas por gelatina, así como cápsulas blandas, selladas compuestas por gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los compuestos activos en forma de gránulos que pueden mezclarse con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco y estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos se disuelven o suspenden preferiblemente en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, o parafina líquida. Además, pueden añadirse estabilizantes.

Las posibles preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en una combinación de uno o más de los compuestos activos con una base de supositorio. Bases de supositorio adecuadas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, o hidrocarburos de parafina. Además, también es posible usar cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación de los compuestos activos con una base. Los materiales de base posibles incluyen, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles o hidrocarburos de parafina.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales de amonio solubles en agua (especialmente tris, bis-tris-propano y colina) y disoluciones alcalinas. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas. Los vehículos o disolventes lipófilos adecuados incluyen ácidos grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos o polietilenglicol-400 (los compuestos son solubles en PEG-400). Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes.

La caracterización de los sitios de unión a glicina *in vitro* ha sido difícil debido a la carencia de ligandos de fármaco selectivos. Por tanto, pueden usarse ligandos de glicina de la presente invención para caracterizar el sitio de unión a glicina. Las 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas sustituidas particularmente preferidas que pueden usarse para este fin son derivados radiomarcados isotópicamente, por ejemplo en los que uno o más de los átomos se sustituyen por ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{15}N o ^{18}F . Además, pueden incorporarse emisores de positrones tales como ^{11}C y ^{18}F en la 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona para su uso en la tomografía de emisión de positrones (PET) para la localización de los sitios de unión a glicina. Además, pueden usarse 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas sustituidas con ^{123}I para la obtención de imágenes mediante tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) del sitio de unión a glicina. Además, pueden prepararse compuestos marcados isotópicamente que no son radiactivos para su uso en estudios metabólicos, por ejemplo en los que uno o más de los hidrógenos y/o carbonos se enriquecen en ^2H o ^{13}C .

Ejemplos

Materiales y métodos

5 En los siguientes ejemplos 1-27, todos los ^1H RMN se ejecutaron a 300 MHz y los ^{13}C RMN a 75 MHz en un instrumento QE-300 y en referencia al disolvente de protio residual. Se ejecutaron los ^{19}F RMN a 339 MHz en un instrumento NT-360 y en referencia a C_6F_6 externo. Se tomaron los puntos de fusión en un aparato de punto de fusión Mel-Temp y no están corregidos. Se colocaron las muestras en el bloque cuando la temperatura era $>250^\circ\text{C}$ con el fin de minimizar la descomposición antes de la fusión. Se destiló DMF antes de su uso. Todos los demás reactivos se usaron tal como se recibieron del fabricante. Los compuestos se adquirieron de Aldrich Chemical Co. a menos que se indique lo contrario a continuación. 1,2-Dinitro-3,4,5,6-tetraclorobenceno, 5,6-diamino-1,3-dimetiluracilo hidratado y 1,2-diamino-3-cloro-5-trifluorometilbenceno se adquirieron de Maybridge Chemical. 3-Fluoro-6-nitroanilina se obtuvo del Dr. Michael Scherz. 1,2-Diamino-4-cloro-5-fluorobenceno, 1,2-diamino-3-cloro-5-trifluorometilbenceno y 1,2-diamino-3-bromo-5-trifluorometilbenceno se adquirieron de PCR Chemical.

15

Ejemplo 1

Preparación de 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

20

Método A

6,7-Dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona. (1) Se agitó una mezcla de 422 mg (2,5 mmol) de 4,5-dicloro-*o*-fenilendiamina (Pfaltz & Bauer, Inc., usada tal como se recibió) y 1,10 g (7,5 mmol) de oxalato de dietilo (Sigma, usado tal como se recibió) bajo Ar a 160°C durante 2 h, luego a 180°C durante 7 h. Se permitió que la mezcla de reacción se enfriase hasta t.a. (22°C), se diluyó con hexanos (10 ml), se recogió el precipitado mediante centrifugación y se lavó con hexanos (2 x 10 ml). Se agitó el sólido gris con 40 ml de NaOH ac. (aproximadamente 1 N) y carbón activado (0,4 g) a t.a. durante 30 min., se eliminó el carbón mediante filtración a vacío y se lavó con H_2O destilada (6 x 10 ml), que se combinaron con el filtrado original, se acidificaron sin HCl ac. aproximadamente 4 N (aproximadamente 20 ml). Se recogió el precipitado blanco mediante filtración a vacío, se lavó con H_2O destilada (5 x 10 ml), EtOH (3 x 5 ml), entonces se secó a 60°C bajo 0,1 mmHg durante 8 h produciendo 426 mg (73,8%) de 1 como un sólido color crema. p.f. $>400^\circ\text{C}$ ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) 12,010 (s, 2H) 7,226 (s, 2H) ppm.

30

5-Nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona. (2) Se disolvió compuesto 1 (416 mg, 1,80 mmol) en 5,5 ml de H_2SO_4 conc. a 0°C con agitación. A esta disolución gris intenso resultante se le añadieron 202 mg (2,22 mmol) de KNO_3 finamente molido (Baker, usado tal como se recibió) a 0°C con agitación. Se agitó la mezcla a 0°C durante 3 h, luego a t.a. (22°C) durante 30 h. Se añadió la mezcla de reacción a hielo- H_2O (60 g), se recogió el precipitado mediante filtración a vacío, se lavó con H_2O destilada (5 x 10 ml), EtOH (3 x 5 ml), luego se secó bajo 0,1 mm Hg a 80°C durante 2 h produciendo 443,5 mg (89,6%) de 2 bruto como un sólido amorfo color crema (el ^1H RMN indicó que era puro al 95-98%).

40

La purificación adicional fue tal como sigue:

Se disolvieron 443 mg de 2 bruto (obtenido anteriormente) en NaOH ac. aproximadamente 1 N (120 ml) a t.a., se añadió carbón activado (1 g), luego se agitó a t.a. durante 15 min. Se eliminó el carbón mediante filtración a vacío, se lavó con H_2O destilada (2 x 10 ml). Se acidificó el filtrado combinado hasta pH 2 con HCl ac. aproximadamente 4 N (aproximadamente 50 ml). Se recogió el precipitado mediante filtración a vacío, se lavó con H_2O destilada (5 x 10 ml), EtOH (2 x 5 ml), se secó bajo 0,1 mmHg a 80°C durante 2 h produciendo 327 mg (recuperación del 74%) de 2 esencialmente puro, p.f. $350-4^\circ\text{C}$ (desc.). (El ^1H RMN indicó que casi no había impurezas presentes).

50

Recristalización: se disolvieron 315 mg de 2 más puro (obtenido anteriormente) en 45 ml de DMSO, a esta disolución se le añadió H_2O (aproximadamente 1 ml) gota a gota hasta que se produjo un precipitado. Se calentó la mezcla (en un baño de aceite a $100-105^\circ\text{C}$) con agitación (usando una barra magnética pequeña), se añadió gota a gota H_2O (aproximadamente 1 ml) hasta que se formó una mezcla turbia y se añadió gota a gota DMSO para producir una disolución transparente. Tras permanecer en reposo a t.a. durante 8 h, se recogieron los microcristales amarillos mediante filtración a vacío, se lavaron con H_2O (5 x 10 ml), EtOH (2 x 3 ml), se secaron bajo 0,1 mm Hg a 80°C durante 3 h produciendo 286 mg (recuperación del 90,8%) de 2 puro, p.f. $354-7^\circ\text{C}$.

55

Método B

4,5-Dicloro-1,2-fenilendiamina (1) A una suspensión de 6,21 g (30,0 mmol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (Aldrich, usado tal como se recibió) en EtOH (100 ml) se le añadieron 310 mg de Pd al 5%/C, se hidrogenó la mezcla a 30-20 parr de H_2 durante 4 h, luego se filtró. Se evaporó por rotación el filtrado hasta sequedad. Se agitó el residuo sólido negro con 250 ml de HCl ac. 2 N durante 20 min., luego se filtró. Se basificó el filtrado hasta pH 13 con NaOH ac. 4 N (125 ml). Se recogió el precipitado en un embudo sinterizado mediante filtración a vacío, se lavó con H_2O (5 x 10 ml), se secó a 40°C bajo 0,1 mmHg durante 16 h dando 3,72 g (70%) del producto bruto como un polvo de color café.

65

ES 2 313 714 T3

Se purificó el producto bruto (3,70 g) obtenido anteriormente mediante cristalización en benceno (60 ml) produciendo 3,17 g (recuperación del 85%) como escamas ligeramente púrpuras, que eran puras mediante CCF (CHCl₃: EtOH = 9:1). P.f. 159-60°C (Aldrich: 159-62°C).

5 *6,7-Dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona*: se sometió a reflujo una suspensión de 2,655 g (15,0 mmol) de 4,5-diclorofenileno-1,2-diamina y 1,986 g (15,75 mmol) de ácido oxálico dihidratado (Fisher Scientific Co., usado tal como se recibió) en 22,5 ml de HCl ac. 2 N con agitación a 125°C (temperatura del baño) durante 2,5 h, (durante los primeros 5 min. de calentamiento, la suspensión casi se volvió una disolución, luego comenzó a formar un precipitado). Se permitió que la mezcla de reacción se enfriase hasta 22°C, y se añadió H₂O (50 ml). Se recogió el precipitado en un embudo Hirsh mediante filtración a vacío, se lavó con H₂O (6 x 25 ml) y se secó a 60°C bajo 0,1 mmHg durante 12 h produciendo 3,39 g (98%) de 6,7-dicloroquinoxalin-2,3-diona como un polvo rosa intenso. P.f. > 400°C. ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 12,016 (s, 2H), 7,234 (s, 2H). Este producto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

15 *6,7-Dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona*: se disolvieron 3,335 g (14,5 mmol) de 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en 65 ml de H₂SO₄ conc. con agitación y enfriamiento en un baño de hielo-H₂O, luego se añadieron 2,20 g (21,76 mmol) de KNO₃ (Baker, usado tal como se recibió) en porciones a lo largo de 10 min. con agitación. Se agitó la mezcla resultante a 22°C bajo N₂ durante 20 h. entonces se vertió lentamente en hielo-H₂O (400 ml) con agitación. Se recogió el precipitado en un embudo sinterizado mediante filtración a vacío, se lavó con H₂O (5 x 10 ml) y se secó a 60°C bajo 0,1 mmHg durante 12 h produciendo 3,39 g (85%) de la 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona bruta como un polvo gris amarillo. Pureza: > 98,5% basándose en el análisis por HPLC.

25 Se purificó el compuesto tal como sigue. Se añadieron 3,365 g de 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona obtenida anteriormente a 550 ml de NaOH ac. 1 N y se agitó vigorosamente durante 20 min. Se filtró la mezcla resultante mediante filtración a vacío a través de un embudo sinterizado para eliminar una pequeña cantidad de material insoluble. Al filtrado se le añadió lentamente HCl conc. (aproximadamente 43 ml) (gota a gota) con agitación vigorosa para ajustar el pH desde 13 hasta 11 (usando un pH-metro para monitorizar). (Un experimento de blanco mostró que la 6,7-dicloroquinoxalin-2,3-diona, el material de partida para la reacción de nitración, podría precipitarse a partir de su disolución en NaOH ac. 1 N sólo en la condición tal que el pH estuviese dentro de 9,5-8.) Se recogió el precipitado en un embudo sinterizado mediante filtración a vacío y se lavó con H₂O (5 x 50 ml). Se añadió el producto húmedo a 200 ml de H₂O, y a esta disolución resultante se le añadió lentamente HCl conc. (gota a gota) para ajustar el pH hasta 5. Se recogió el precipitado en un embudo Hirsh mediante filtración a vacío, se lavó con H₂O (8 x 50 ml) y se secó a 60°C bajo 0,1 mmHg durante 16 h produciendo 3,12 g (recuperación del 92,9%) de la 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona más pura. P.f. 347-8°C. ¹H RMN (DMSO-d₆): 12,265 (sa, 2H), 7,379 (s, 1H). Pureza: > 99,2% basándose en el análisis por HPLC.

35

Ejemplo 2

Preparación de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

40

Se añadieron 439,0 mg (3,0 mmol) de oxalato de dietilo (de Sigma, usado tal como se recibió) a 210,6 mg (1,0 mmol) de 1,2-diamino-3-cloro-5-trifluorometilbenceno (de PCR Inc., usado tal como se recibió), y se calentó la disolución amarilla resultante a 180°C (temperatura del baño) bajo Ar con agitación durante 3,5 h, la disolución se volvió espesa con formación de un precipitado color crema y difícil de agitar. Se permitió que la mezcla de reacción se enfriase hasta t.a. y se trituró con hexano (10 ml). Se recogió el precipitado mediante filtración a vacío, se lavó con hexano (2 x 10 ml) (se guardó el filtrado de hexano combinado), se secó bajo 0,1 mmHg durante 4 h produciendo 134,6 mg (58%) del producto bruto deseado como un polvo amarillo (puro al 95-98% mediante RMN), p.f. 330-2°C (desc.) (bloque precalentado).

50 Se agitó una porción (125,5 mg) del producto bruto obtenido anteriormente con NaOH ac. 1 N (10 ml) a t.a., se acidificó la disolución básica amarilla transparente resultante hasta pH 2 mediante la adición de HCl ac. 5 N (aproximadamente 1,2 ml) gota a gota con agitación a t.a. Se recogió el precipitado blanco mediante centrifugación, se lavó con H₂O (5 x 10 ml), luego se secó mediante evaporación conjunta con EtOH (2 x 10 ml) a 40°C dando 118,8 mg (recuperación del 94,6%) de compuesto puro (mediante RMN) como un polvo blanquecino, p.f. 334-6°C (desc.) (bloque precalentado). Los intentos de recrystalizar en EtOH, EtOH-H₂O y DMSO-H₂O fallaron (esas disoluciones sólo dieron o bien un precipitado o bien no). ¹HRMN (DMSO-d₆) δ: 7,349(s, 1H), 7,604(s, 1H), 11,724(s, 1H), 12,222 (s, 1H) ppm.

60 El filtrado de hexano combinado obtenido anteriormente se evaporó por rotación a 40°C hasta sequedad, se calentó el residuo (aceite naranja viscoso) a 180°C durante 5 h. Se trituró el sólido a granel marrón resultante con hexano (5 ml), se recogió el precipitado mediante centrifugación, se lavó con hexano (4 x 5 ml), luego se agitó con NaOH ac. 1 N (4,5 ml), se centrifugó para eliminar una pequeña cantidad de sólido negro, se acidificó el sobrenadante hasta pH 2 mediante la adición de HCl ac. 5 N (aproximadamente 1 ml) gota a gota con agitación a t.a. Se recogió el precipitado amarillento mediante centrifugación, se lavó con H₂O (5 x 5 ml), luego se secó mediante evaporación conjunta con EtOH (3 x 5 ml) a 40°C produciendo 51,8 mg (22,3%, basándose en la diamina de partida de la primera reacción) del compuesto del título como un polvo amarillento (esencialmente puro mediante RMN), p.f. 334-6°C (bloque precalentado).

65

ES 2 313 714 T3

Tras la recuperación se volvió a usar el material mixto, el rendimiento total fue de aproximadamente el 77%.

El resultado notificado por el presente documento era a partir de uno de tres experimentos y era reproducible. También se intentó la reacción con una razón 1:2 de la diamina con respecto al oxalato usando el mismo procedimiento que para la razón 1:3, pero el producto era complicado.

Alternativamente, se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman, G.W.H., *J. Chem. Soc.* 1171 (1962). Se calentó hasta reflujo una mezcla de oxalato de dietilo (1,34 g, 9,60 mmol) y 1,2-diamino-3-cloro-5-trifluorometilbenceno (200 mg, 0,95 mmol) bajo N₂ durante 2 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH helado (10 ml). Se disolvió este sólido amarillo blanco en NaOH 1 N (15 ml) y se eliminaron unas pocas partículas insolubles mediante filtración por gravedad. Se trató la disolución con carbón decolorante y la mezcla se filtró a través de un lecho de Celite y la disolución resultante se acidificó con HCl 4 N. Se formó un precipitado que se aisló mediante filtración a vacío y se lavó con agua (20 ml). Se secó este sólido blanco en una pistola de secado (0,05 torr, 78°C) dando 91,9 mg (36,0%), p.f. 346-348°C (desc.). ¹H RMN (d₆-dmsd) δ 7,30 (s, 1H, ArH), 7,53 (s, 1H, ArH), 11,9 (s a, 2H, NH). ¹⁹F RMN (patrón externo C6F6, δ -162,9) δ -58,43 (s). EI-HRMS calc. para C₉H₄ClF₃N₂O₂ 263,9912, hallado 263,9891.

Ejemplo 3

Preparación de 5-cloro-7-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

2-Cloro-4-fluoro-6-nitroanilina

Se preparó 2-cloro-4-fluoro-6-nitroanilina usando una adaptación del método de Mitchell, *et al.* (Mitchell, R.H. *et al.*, *J. Org. Chem.* 44:4733 (1979)). A una disolución de 4-fluoro-2-nitroanilina (500 mg, 3,2 mmol) en DMF seca (10 ml) bajo N₂ se añadió gota a gota una disolución de N-clorosuccinimida (426 mg, 3,2 mmol) en DMF seca (16 ml). Se permitió que la reacción se agitase durante la noche. Entonces se vertió la disolución en 100 ml de H₂O y se extrajo la suspensión turbia resultante con 4 x 25 ml de acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con 4 x 25 ml de H₂O y 25 ml de de disolución saturada de NaCl y se secaron (MgSO₄). Se filtró a vacío el MgSO₄ y se evaporó por rotación el disolvente dando un sólido cristalino marrón que se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida (hexanos:acetato de etilo 2:1) dando 424 mg de un sólido cristalino naranja (69,5%) ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,46 (s a, 2H, NH₂), 7,42 (dd, J_{H5-3} = 3 Hz, J_{H3-F} = 7,2 Hz, H-4), 7,85 (dd, J_{H5-3} = 3 Hz, J_{H5-F} = 8,7 Hz, H-5).

1,2-Diamino-3-cloro-5-fluorobenceno

Se preparó 1,2-diamino-3-cloro-5-fluorobenceno usando una adaptación del método de Bellamy, *et al.*, (Bellamy, F.D. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 25:839 (1984)). Se calentó una mezcla de 2-cloro-4-fluoro-6-nitroanilina (424 mg, 2,22 mmol) y SnCl₂ 2H₂O (2,50 g, 11,1 mmol) disuelta en 7 ml de acetato de etilo y 3 ml de etanol absoluto bajo N₂ a 70°C durante 2,5 h. Todo el material de partida había reaccionado tal como se comprobó mediante CCF (gel de sílice, hexanos:acetato de etilo 2:1). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en 20 ml de hielo triturado. Se añadió suficiente NaHCO₃ sólido (¡formación de espuma!) para llevar el pH hasta 6. Entonces se extrajo la emulsión amarilla blanca espesa con 3 x 25 ml de acetato de etilo y se lavaron los extractos orgánicos combinados con disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando un aceite marrón oscuro que cristalizó en reposo dando 290 mg (82%) ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,59 (s a, 4H, 2(NH₂)); 6,37 (dd, 1H, H5, J₄₋₅ = 2,7, J_{H-F} = 9,3); 6,55 (dd, 1H, H4, J₄₋₅ = 2,7, J_{HF} = 8,4).

5-Cloro-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó 5-cloro-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. *J. Chem. Soc.* 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (2,64 g, 18,1 mmol) y 1,2-diamino-3-cloro-5-fluorobenceno (290 mg, 1,81 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 10 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogieron los cristales amarillo-marrón brillantes mediante filtración a vacío y se aclararon con EtOH (10 ml) y se secaron al aire dando 164,1 mg (42%). Se tomó una parte de este sólido y se disolvió en 10 ml de NaOH 1 N. Se trató la disolución con carbón activado y se filtró a través de un lecho de Celite. Se acidificó cuidadosamente la disolución resultante con HCl 1 N (pH = 6). Se formaron lentamente agujas amarillo pálido en la disolución y se recogieron mediante filtración a vacío, se aclararon con 20 ml de H₂O y se secaron adicionalmente a vacío (0,1 torr, 78°C) dando 67,8 de cristales amarillo pálido pulverulentos. P.f. 306-308°C (desc.), ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,28 (s, 1H, ArH), 7,56 (s, 1H, ArH), 11,7 (s a, 2H, NH), EI-EM m/z 216 (M+2,34, 214 (M+, pb), 188 (21), 186 (68), 123 (61), 131 (62). EI-HRMS calc. para C₈H₄ClFN₂O₂ 213,9945, hallado 213,9961.

Ejemplo 4

Preparación de 5-cloro-6,7-difluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

5 2-Cloro-3,4-difluoro-6-nitroanilina

Se preparó 2-cloro-3,4-difluoro-6-nitroanilina usando una adaptación del método de Mitchell *et al.* (Mitchell, R.H. *et al.*, J. Org. Chem. 44:4733 (1979)). A una disolución de 4,5-difluoro-2-nitroanilina (500 mg, 2,87 mmol) en DMF (16 ml) bajo N₂ se le añadió N-clorosuccinimida (401 mg, 3,00 mmol) en DMF. Se permitió que la reacción se agitase durante 48 h. Entonces se vertió la disolución en 75 ml de H₂O. Entonces se extrajo la suspensión naranja turbia que se formó con 4 x 25 ml de cloruro de metileno. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con 5 x 20 ml de H₂O y 25 ml de disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄) y se eliminó el agente de secado mediante filtración a vacío. Se evaporó el disolvente por rotación dando un aceite amarillo naranja que cristalizó en reposo. El ¹H RMN mostró que este sólido era una mezcla de producto clorado y material de partida. Se separó la mezcla mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, hexanos: acetato de etilo 3:1) dando 162 mg de un sólido cristalino amarillo (27%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,60 (s a, 2H, NH₂), 8,00 (m, 1H, H-5). Había una contaminación con material de partida del 17% mediante RMN.

20 3-Cloro-4,5-difluoro-1,2-diaminobenceno

Se preparó 3-cloro-4,5-difluoro-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Bellamy *et al.* (Bellamy, F. D. *et al.*, Tetrahedron Lett. 25:839 (1984)). Se disolvió una mezcla de 2-cloro-3,4-difluoro-6-nitroanilina (160 mg, 0,767 mmol) y SnCl₂·2H₂O (0,863 g, 3,84 mmol) en 5 ml de acetato de etilo y 2 ml de etanol absoluto bajo N₂ y se calentó a 75°C durante 5 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en 50 ml de H₂O. Se añadió suficiente disolución saturada de NaHCO₃ (¡formación de espuma!) para llevar el pH hasta 7. Se extrajo la mezcla resultante con 3 x 20 ml de acetato de etilo y se lavaron los extractos orgánicos combinados con 20 ml de disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando un sólido marrón, 124 mg (91%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,52 (s a, 4H, 2(NH₂)); 6,49 (dd, 1H, J_{HF} = 7,5, 10,8 Hz, H-6). Estaba presente un 13% de 4,5-difluoro-1,2-diaminobenceno mediante RMN.

5-Cloro-6,7-difluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem.Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (981 mg, 6,72 mmol) y 3-cloro-4,5-difluoro-1,2-diaminobenceno (120 mg, 0,670 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 15 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido gris mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH helado (10 ml) y se secó al aire. Se tomó el sólido y se disolvió en 5 ml de NaOH 1 N con calentamiento. Se trató la disolución con carbón activado y se filtró a través de un lecho de Celite. Se acidificó cuidadosamente la disolución resultante con HCl 1 N (pH = 1). Se formó un polvo blanco en la disolución a pH = 6, pero unas pocas gotas de NaOH 1 N aclararon la disolución y tras la adición de una pocas gotas de HCl 1 N se formaron lentamente agujas blancas en la disolución. Estas se recogieron mediante filtración a vacío, se aclararon con 20 ml de H₂O y se secaron a vacío (0,1 torr, 78°C) dando 24,9 (16%) de agujas amarillo pálido. ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,05 (dd, 1H, J = 10,5, H-8), 11,6 (s a, 1H, NH), 12,0 (s a, 1H, NH). Estaba presente un 13% de 6,7-difluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona mediante RMN.

Ejemplo 5

Preparación de 5-bromo-6,7-difluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

50 2-Bromo-3,4-difluoro-6-nitroanilina

Se preparó 2-bromo-3,4-difluoro-6-nitroanilina usando una adaptación del método de Mitchell *et al.* (Mitchell, R.H. *et al.*, J. Org. Chem. 44:4733 (1979)). A una disolución de 4,5-difluoro-2-nitroanilina (500 mg, 2,87 mmol) en DMF (25 ml) bajo N₂ se le añadió toda de una vez N-bromosuccinimida (511 mg, 2,87 mmol) en DMF seca (16 ml). Se permitió que la reacción se agitase durante la noche. La CCF (hexanos:acetato de etilo 1:1) mostró todavía algo de material de partida presente. Se añadió N-bromosuccinimida adicional (100 mg) y se agitó la reacción otras 12 h. Entonces se vertió la disolución en 100 ml H₂O y se extrajo la suspensión turbia resultante con 3 x 20 ml de cloruro de metileno. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con 4 x 25 ml de H₂O y 25 ml de disolución saturada de NaCl y se secaron (MgSO₄). Se filtró el MgSO₄ a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando un aceite amarillo marrón que cristalizó lentamente dando 700 mg (96%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,70 (s a, 2H, NH₂), 7,99 (m, 1H, H-5).

65 3-Bromo-4,5-difluoro-1,2-diaminobenceno

Se preparó 3-bromo-4,5-difluoro-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Bellamy *et al.* (Bellamy, F.D. *et al.*, Tetrahedron Lett. 25:839 (1984)). Se calentó una mezcla de 2-bromo-3,4-difluoro-6-nitroanilina (700 mg, 2,78 mmol) y SnCl₂·2H₂O (3,14 g, 13,9 mmol) disuelta en 7 ml de acetato de etilo y 3 ml de etanol absoluto

ES 2 313 714 T3

bajo N₂ a 75°C durante 2 h. Todo el material de partida había reaccionado tal como se comprobó mediante CCF (gel de sílice, hexanos:acetato de etilo 2:1). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en 20 ml de hielo triturado. Se añadió suficiente disolución saturada de NaHCO₃ (¡formación de espuma!) para llevar el pH hasta 5. Entonces se extrajo la emulsión amarilla blanca espesa con 3 x 25 ml de acetato de etilo y se lavaron los extractos orgánicos combinados con disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando un aceite marrón oscuro que cristalizó en reposo dando 410 mg (66%).¹H RMN (CDCl₃) δ 3,59 (s a, 4H, 2(NH₂)); 6,52 (m, 1H, H-6).

5-Bromo-6,7-difluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (2,70 g, 18,5 mmol) y 3-bromo-4,5-difluoro-1,2-diaminobenceno (410 mg, 1,85 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 15 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido marrón oscuro mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH (20 ml) y se secó al aire dando 215 mg (42%). Se tomó una parte de este sólido (150 mg) y se disolvió en 20 ml de NaOH 1 N con calentamiento. Se trató la disolución con carbón activado y se filtró a través de un lecho de Celite. Se acidificó cuidadosamente la disolución resultante con HCl 1 N (pH = 1). Se formaron lentamente agujas amarillo pálido en la disolución y se recogieron mediante filtración a vacío, se aclararon con 20 ml de H₂O y se secaron a vacío (0,1 torr, 78°C) dando 67,8 mg de cristales amarillo pálido pulverulentos, p.f. 306-310°C (desc.).¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,09 (dd, 1H, J = 7,5, H-8), 11,3 (s a, 1H, NH), 12,1 (s a, 1H, NH). EI-EM m/z 278 (M+2, 75), 276 (M+, 77), 250 (56), 248 (57), 141 (pb). EI-HRMS calc. para C₈H₄BrF₂N₂O₂ 275,9346, hallado 275,9331.

Ejemplo 6

Preparación de 6-bromo-7-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

4-Bromo-3-fluoro-6-nitroanilina

Se preparó 4-bromo-3-fluoro-6-nitroanilina usando una adaptación del método de Mitchell *et al.* (Mitchell, R.H. *et al.*, J. Org. Chem. 44:4733 (1979)). A una disolución de 3-fluoro-6-nitroanilina (500 mg, 3,2 mmol) en DMF seca (15 ml) bajo N₂ se le añadió gota a gota una disolución de N-bromosuccinimida (626 mg, 3,2 mmol) en DMF seca. Se permitió que la reacción se agitase durante 48 h. Entonces se vertió la disolución en 100 ml de H₂O. Entonces se extrajo la suspensión amarilla turbia que se formó con 4 x 25 ml de cloruro de metileno. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con 4 x 25 ml de H₂O y 25 ml disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄) y se eliminó el agente de secado mediante filtración a vacío. Se evaporó por rotación el disolvente dando un aceite amarillo naranja que cristalizó en reposo. El ¹H RMN mostró que este sólido era una mezcla de productos mono y dibromados en una razón de 3,8:1. Se separó la mezcla mediante cromatografía ultrarrápida (hexanos:acetato de etilo 2:1) dando 324 mg de un sólido amarillo (43%).¹H RMN (CDCl₃) δ 6,19(s a, 2H, NH₂); 6,58(d, 1H, J_{HF} = 9,6, ArH); 8,39(d, 1H, J_{HF} = 6,9, ArH).

4-Bromo-5-fluoro-1,2-diaminobenceno

Se preparó 4-bromo-5-fluoro-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Bellamy *et al.* (Bellamy, F.D. *et al.*, Tetrahedron Lett. 25:839 (1984)). Se calentó una mezcla de 4-bromo-3-fluoro-6-nitroanilina (320 mg, 1,36 mmol) y SnCl₂ 2H₂O (1,53 g, 6,81 mmol) disuelta en 7 ml de acetato de etilo y 3 ml de etanol absoluto bajo N₂ a 75°C durante 8 h. Permanecía algo de material de partida (mediante CCF) tras sólo una 1 h de calentamiento. Todo el material de partida había reaccionado tras 8 h tal como se comprobó mediante CCF (gel de sílice, hexanos:acetato de etilo 3:1). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en 50 ml de H₂O. Se añadió suficiente disolución saturada de NaHCO₃ (¡formación de espuma!) para llevar el pH hasta 5. Se extrajo la mezcla resultante con 3 x 25 ml de acetato de etilo y se lavaron los extractos orgánicos combinados con 20 ml de disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando un polvo blanco 277 mg (99%).¹H RMN (CDCl₃) δ 3,22 (s a, 2H, NH₂); 3,60 (s a, 2H, NH₂); 6,50 (d, 1H, J_{HF} = 9,6 Hz, H-6); 6,83 (d, 1H, J_{HF} = 6,6 Hz, H-3).

6-Bromo-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (1,97 ml, 13,5 mmol) y 4-bromo-5-fluoro-1,2-diaminobenceno (277 mg, 1,35 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 12 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido marrón oscuro mediante filtración a vacío y se aclaró con etanol (20 ml) y se secó al aire dando 233 mg (67%) de un sólido marrón pulverulento. Se tomó una porción de este sólido (100 mg) y se disolvió en 5 ml de NaOH 1 N. Se trató la disolución con carbón activado y se filtró a través de un lecho de Celite. Se aclaró el Celite con 10 ml de disolución de NaOH adicional. Se acidificó cuidadosamente la disolución resultante con HCl 1 N (pH = 5). Se formaron lentamente agujas amarillo brillante en la disolución y se recogieron mediante

ES 2 313 714 T3

filtración a vacío, se aclararon con 15 ml de H₂O y se secaron a vacío (0,1 torr, 78°C) dando 40,0 mg de cristales amarillos. ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 6,99 (d, 1H, J = 9,3, H-8), 7,29 (d, 1H, J=6,3, H-6), 11,95 (s a, 2H, 2(NH)). EI-EM m/z 260 (M+2, 96), 258 (M+ (pb)), 232 (51), 230 (52), 123 (83). EI-HRMS calc. para C₈H₄BrFN₂O₂ 256,9941, hallado 257,9441.

5

Ejemplo 7

Preparación de 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

10

3,5-Dicloro-1,2-diaminobenceno

Se preparó 3,5-dicloro-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Bellamy, *et al.* (Bellamy, F.D. *et al.*, Tetrahedron Lett. 25:839 (1984)). Se calentó una mezcla de 2,4-dicloro-6-nitroanilina (1,00 g, 4,8 mmol) y SnCl₂·2H₂O (5,41 g, 24,1 mmol) disuelta en 10 ml de acetato de etilo y 5 ml de etanol absoluto bajo N₂ a 70°C durante 1 h. Todo el material de partida había reaccionado tal como se comprobó mediante CCF (gel de sílice, hexanos:acetato de etilo 3:1). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en 40 ml de hielo triturado. Se añadió suficiente disolución saturada de NaHCO₃ (¡formación de espuma!) para llevar el pH hasta 5. Se extrajo la emulsión blanca espesa/de aceite naranja con 3 x 25 ml de acetato de etilo y se lavaron los extractos orgánicos combinados con disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando a aceite naranja pálido que cristalizó en reposo dando 789 mg (93%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,69 (s a, 4H, 2(NH₂)); 6,61 (s, 1H, H-6); 6,82 (s, 1H, H-4).

5,7-Dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título (Leeson, P.D. *et al.*, J. Med. Chem 34:1243 (1991)) usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (4,12 g, 28,2 mmol) y 3,5-dicloro-1,2-diaminobenceno (500 mg, 2,82 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 6 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido brillante amarillo pálido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH (20 ml) y se secó al aire dando 286 mg (44%). P.f. 326-328°C (desc.) véase la bibliografía 337-340°C). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,05 (d, 1H, J = 1,8, H-8), 7,32 (d, 1H, J = 1,8, H-6), 11,5 (s a, 1H, NH), 12,1 (s a, 1H, NH). EI-EM m/e 234 (M+4, 12), 232 (M+2, 67), 230 (M+, pb), 204 (52), 202 (77), 141 (19), 142 (59) EI-HRMS calc. para C₈H₄Cl₂N₂O₂ 229,9650, hallado 229,9646.

35

Ejemplo 8

Preparación de 5,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

40

3,5-Dibromo-1,2-diaminobenceno

Se preparó 3,5-dibromo-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Bellamy, *et al.* (Bellamy, F.D. *et al.*, Tetrahedron Lett. 25:839 (1984)). Se calentó una mezcla de 2,4-dibromo-6-nitroanilina (500 mg, 1,69 mmol) y SnCl₂·2H₂O (1,90 g, 8,45 mmol) en 5 ml de acetato de etilo y 2 ml de etanol absoluto bajo N₂ a 70°C durante 1 h. Todo el material de partida había reaccionado tal como se comprobó mediante CCF (gel de sílice, hexanos:acetato de etilo 3:1). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en 20 ml de hielo triturado. Se añadió suficiente disolución saturada de NaHCO₃ (¡formación de espuma!) para llevar el pH hasta 5. Se filtró a vacío la emulsión amarilla blanca espesa y se extrajo el filtrado con 3 x 25 ml de acetato de etilo y se lavaron los extractos orgánicos combinados con disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando un aceite amarillo pálido que cristalizó en reposo dando 400 mg (89%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,62 (s a, 4H, 2(NH₂)); 6,78 (d, J = 1,8, 1H, H-6); 7,01 (d, J = 1,8, 1H, H-4).

5,7-Dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (2,19 g, 15,0 mmol) y 3,5-dibromo-1,2-diaminobenceno (400 mg, 1,50 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 6 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido brillante marrón pálido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH (20 ml) y se secó al aire dando 264 mg (55%). Se tomó una porción de este sólido (150 mg) y se disolvió en 20 ml de NaOH 1 N con calentamiento. Se trató la disolución con carbón activado y se filtró a través de un lecho de Celite. Se acidificó cuidadosamente la disolución resultante con HCl 2 N (pH = 1). Se formaron lentamente agujas amarillo pálido en la disolución y se recogieron mediante filtración a vacío, se aclararon con 20 ml de H₂O y se secaron a vacío (0,1 torr, 78°C) dando 50,0 mg de sólido blanco pulverulento, p.f. 356-358°C (desc.). ¹HRMN (d₆-DMSO) δ 7,21 (d, 1H, J = 2,1, H-8), 7,53 (d, 1H, J = 2,1, H-6), 11,1 (s a, 1H, NH), 12,1 (s a, 1H, NH). EI-EM m/z 322 (M+4, 51,3), 320 (M+2, pb), 318 (M+, 53,9), 294 (32,2), 292 (62,6), 290 (28,7), 185 (24,3), 183 (25,2). EI-HRMS calc. para C₈H₄Br₂N₂O₂ 317,8641, hallado 317,8642.

65

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 9

Preparación de 5,6,7,8-tetracloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

5 Se preparó 1,2-diamino-3,4,5,6-tetraclorobenceno usando una adaptación del método de Bellamy *et al.* (Bellamy, F.D. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 25:839 (1984)). Se calentó una mezcla de 1,2-dinitro-3,4,5,6-tetraclorobenceno (1,00 g, 3,27 mmol) y SnCl₂·2H₂O (3,69 g, 16,4 mmol) disuelta en 10 ml de acetato de etilo y 5 ml de etanol absoluto bajo N₂ a 80°C durante 1 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en 20 ml de hielo triturado. Se añadió suficiente disolución saturada de NaHCO₃ (¡formación de espuma!) para llevar el pH hasta 6. Se extrajo la emulsión blanca espesa con 3 x 25 ml de acetato de etilo y se lavaron los extractos orgánicos combinados con disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando 569 mg de un sólido marrón (71%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,96 (s a, 2(NH₂)). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 118,2, 127,0, 132,0.

15 *5,6,7,8-Tetracloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona* (Barton, D.E.; Lamb, A.J.; Lane, D.L.J.; Newbold, G.T.; Percival, D., *J. Chem. Soc. (C)*, 1268 (1968).

20 Se preparó 5,6,7,8-tetracloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. *J. Chem. Soc.* 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (2,97 g, 20,0 mmol) y 1,2-diamino-3,4,5,6-tetraclorobenceno (500 mg, 2,03 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 6 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido naranja mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH frío (10 ml) y se secó al aire. Se recristalizó este sólido en etanol abs. dando 97,0 mg (16%) de un sólido naranja, p.f. 326-328°C (desc.). (véase la bibliografía, >360°). FT-IR: 3198, 3135 cm⁻¹(N-H), 1750, 1623 cm⁻¹(C=O). ¹H RMN δ (d₆-DMSO) δ 11,7 (s a, 2H, N-H) EI-EM m/z 306 (M +8, 1,7), 304 (M+6, 11,5), 302 (M+4, 47,4), 300 (M+2, 93,9), 288 (M+, 76,7), 274 (50,0), 272 (pb), 270 (79,0), 209 (61,0), 207 (64,0). EI-HRMS calc. para C₈H₂Cl₄N₂O₂ 297,8870, hallado 297,8864.

30 Ejemplo 10

Preparación de 5-cloro-6-nitro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5-cloro-8-nitro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencias)

35 Se prepararon los compuestos del título usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. *J. Chem. Soc.* 1171 (1962)). Se disolvió 6-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (500 mg, 1,89 mmol) en 15 ml de H₂SO₄ concentrado y se enfrió la disolución transparente hasta 0°C con agitación. A esto se le añadió KNO₃ en pequeñas porciones (191 mg, 1,89 mmol). Se permitió que la reacción se agitase durante 1 h a 0°C y luego se permitió que llegase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Entonces se vertió la mezcla de reacción amarillo pálido en 50 ml de hielo-H₂O. Se aisló el producto mediante filtración a vacío como un sólido blanco que se aclaró con una pequeña cantidad de H₂O fría y se secó al aire. Se disolvió el sólido blanco en una cantidad mínima de DMSO caliente. Se añadió gota a gota H₂O en ebullición, con calentamiento tras cada adición, hasta que el precipitado no podía disolverse. Se añadieron unas pocas gotas de DMSO hasta que la disolución era transparente, y se permitió que la disolución se enfriase lentamente hasta temperatura ambiente. Se aisló el sólido blanco mediante filtración a vacío y se permitió que se secase al aire. Se secó adicionalmente el sólido a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 241,6 mg de una mezcla de los productos de 6-nitro y 8-nitro en una razón de 3,3:1 mediante ¹H RMN. Se aisló el precipitado que se formó en el filtrado anterior mediante filtración a vacío, se aclaró con 50 ml de H₂O y se secó como anteriormente dando un polvo blanco (80,7 mg) que era una mezcla de los productos de 6-nitro y 8-nitro en una razón de 12,6:1. La combinación de las muestras anteriores dio como resultado un rendimiento del 55%, que se corrige para el material de partida sin reaccionar. Se tomó una parte de la mezcla 3,3:1 y se recristalizó en DMSO:H₂O tal como se describió anteriormente, dando cristales pequeños, similares a agujas que se aislaron mediante filtración a vacío dando 21,1 mg de una mezcla de los productos de 6-nitro y 8-nitro en una razón de 1:1,76. Se determinaron las razones de mezclas de producto mediante ¹H RMN, observando la integración de los hidrógenos aromáticos a δ 7,45 y 7,84. Las posiciones de sustitución son provisionales y se basan en desplazamientos químicos relativos de los hidrógenos aromáticos. ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,45 (s, 8-H, producto de 6-nitro), (s, 6-H, producto de 8-nitro), 12,18 (s, N-H), 12,41 (s, N-H). EI-EM m/z 311 (M+2, 35), 309 (M+, pb), 251 (60), 235 (95). EI-HRMS calc. para C₉H₃ClF₃N₃O₄: 308,9733, hallado 308,9768.

60 Se aisló el isómero principal, 5-cloro-6-nitro-7-trifluorometil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona, en forma pura en un rendimiento del 64% mediante cristalización en DMSO-agua. P.f. 343-347°C. Se confirmó la estructura mediante análisis por rayos X.

65

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 11

Preparación de 6-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

3-Fluoro-1,2-diaminobenceno

Se preparó 3-fluoro-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Tsuji *et al.* (Tsuji, Y. *et al.*, J. Org. Chem. 55:580 (1990)). Se calentó una suspensión de polvo de Zn (10,5 g, 0,160 mol), CaCl₂ (1,05 g) y H₂O en 40 ml de EtOH hasta reflujo con agitación bajo N₂. A esto se le añadió lentamente gota a gota una disolución de 4-fluoro-2-nitroanilina (2,00 g, 12,8 mmol) en 10 ml de EtOH. Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 8 h. El análisis por CCF (gel de sílice, benceno:EtOAc 2:1) indicó la desaparición completa del material de partida. Se eliminó el Zn mediante filtración a vacío y se evaporó el disolvente por rotación. Se disolvió el residuo en 50 ml de Et₂O y se extrajo la disolución con 3 x 25 ml de HCl 1 N. Se combinaron las fases acuosas y se basificaron con NaOH ac. al 50% (6 g) y se extrajo la disolución resultante con 3 x 25 ml de Et₂O. Se combinaron las fases de Et₂O y se secaron (MgSO₄). Se evaporó por rotación el disolvente dando 1,36 g (84%) de un sólido marrón. P.f. 90-92°C. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,18 (sa, 2H, NH₂); 3,58 (sa, 2H, NH₂); 6,44 (m, 2H, ArH), 6,61 (m, 1H, ArH).

6-Fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título (Sarges, R. *et al.*, J. Med. Chem. 33:2240 (1990)) usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (17,4 g, 0,100 mol) y 3-fluoro-1,2-diaminobenceno (1,00 g, 7,93 mmol) hasta reflujo con agitación bajo N₂ durante 2 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH (50 ml) dando un sólido gris-marrón que se secó adicionalmente a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 1,06 g (74,4%) que era puro a >98% mediante RMN. Se preparó una muestra analíticamente pura mediante disolución de 60 mg del sólido en NaOH 1,0 N y tratamiento de esta disolución con carbón activado. La filtración de esta mezcla a través de un lecho de Celite y la acidificación con HCl 1 N dieron agujas blancas finas que se recogieron mediante filtración a vacío, se aclararon con H₂O y se secaron adicionalmente a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 25,5 mg de agujas blancas, p.f. 375-380°C (desc.) (véase la bibliografía > 300°C (Sarges, R., *et al.*, J. Med. Chem. 33:2240 (1990)). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 6,90 (m, 2H, ArH), 7,09 (dd, J=9, J=5,4), 11,9 (s, 1H, NH), 11,96 (s, 1H, NH). EI-EM m/z 180 (100, M⁺), 152(44), 124(63), 97(43), 28(53). EI-HRMS calc. para C₈H₅FN₂N₂O₂ 180,0334, hallado 180,0337.

Ejemplo 12

Preparación de 6-ciano-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

3,4-Diaminobenzonitrilo

Se preparó 3,4-diaminobenzonitrilo usando una adaptación del método de Tsuji *et al.* (Tsuji, Y. *et al.*, J. Org. Chem. 55:580 (1990)). Se combinaron polvo de Zn (2,51 g, 38,3 mmol), CaCl₂ (251 mg), H₂O (3,0 ml) y 9,0 ml de EtOH y se llevaron hasta reflujo tal como se describió para 3-fluoro-1,2-diaminobenceno (ejemplo 10) y a esta mezcla se le añadió lentamente gota a gota una disolución de 4-amino-3-nitrobenzonitrilo (500 mg, 3,06 mmol) en 20 ml de EtOH. El análisis y el tratamiento final se describieron para 3-fluoro-1,2-diaminobenceno excepto que se disolvió el residuo de la reacción en 20 ml de HCl 1 N. Entonces se basificó esta disolución mediante la adición de 20 ml de NaOH 1,5 M. Se separó un precipitado como agujas de color tostado finas que se recogieron mediante filtración a vacío, se aclararon con H₂O fría y se secaron en un desecador a vacío (0,5 torr, 25°C) sobre CaSO₄ dando 275 mg (67%) de cristales de color tostado. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,42 (s a, 2H, NH₂), 3,86 (s a, 2H, NH₂), 6,70 (d, J=8, 1H, ArH), 6,96 (d, J=1, 1H, ArH), 7,06 (dd, J=8, J=1, 1H, ArH).

6-Ciano-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (3,90 g, 27,6 mmol) y 3,4-diaminobenzonitrilo (275 mg, 2,06 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 2 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH. Se secó al aire el sólido amarillo marrón dando 156,6 mg (40,8%) que era puro a >98% mediante ¹H RMN. Se preparó una muestra analíticamente pura mediante recristalización de 100 mg en 10 ml de ácido acético glacial dando 21,2 mg de cristales blancos finos. ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,20 (d, J=8,1, 1H, ArH), 7,39 (d, J = 1,2, 1H, ArH), 7,50 (dd, J = 1,2, J = 8,4, 1H, ArH), 12,09 (s, 1H, NH), 12,22 (s, 1H, NH). EI-EM m/z 187(87, M⁺), 159 (100, pb), 131 (83), 104 (77), 77 (65), 53 (43), 28 (30). EI-HRMS calc. para C₉H₅N₃O₂ 187,0381, hallado 187,0377.

65

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 13

Preparación de 6-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

5 1,2-Diamino-3-benzotrifluoruro

Se preparó 1,2-diamino-3-benzotrifluoruro usando una adaptación del método de Tsuji *et al.* (Tsuji, Y. *et al.*, J. Org. Chem. 55:580 (1990)). Se combinaron polvo de Zn (3,93 g, 60,1 mmol), CaCl₂ (393 mg), H₂O (4,65 ml) y 14,1 ml de EtOH y se llevaron hasta reflujo tal como se describió para 3-fluoro-1,2-diaminobenceno (véase el ejemplo 10) y a esta mezcla se le añadió lentamente gota a gota una disolución de 4-amino-3-nitrobenzotrifluoruro en 5 ml de EtOH. El análisis y el tratamiento final se describieron para 3-fluoro-1,2-diaminobenceno (véase el ejemplo 10) excepto que se disolvió el residuo de la reacción en 30 ml de HCl 1 N. Entonces se lavó esta disolución con 3 x 35 ml de Et₂O. Entonces se basificó la fase acuosa con NaOH al 50% y se extrajo la disolución resultante con 3 x 25 ml de Et₂O. Se combinaron las fases orgánicas y se secaron (MgSO₄) y se evaporó el disolvente a presión reducida dando 641 mg (75,9%) de un sólido marrón oscuro. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,54 (s a, 4H, NH₂), 6,73 (m, 1H, ArH), 6,93 (m, 2H, ArH).

6-Trifluorometil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (3,72 g, 25,5 mmol) y 1,2-diamino-3-benzotrifluoruro (300 mg, 1,70 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 2 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío. Se aclaró este sólido amarillo marrón con hexanos y se secó al aire. El secado adicional a vacío (0,1 torr, 25°C) produjo 240,1 mg (61,4%) que era puro a >95% mediante ¹H RMN. Se obtuvo una mezcla analítica mediante recristalización en acetona-éter dando un sólido amarillo-blanco. ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,44 (t, 2H, ArH), 7,56 (s, 1H, ArH), 10,98 (sa, 1H NH), 11,08 (s a, 1H, NH). EI-EM m/z 230 (100, pb, M+), 202(46).

30 Ejemplo 14

Preparación de 6,7-difluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

35 3,4-Difluoro-1,2-diaminobenceno

Se preparó 3,4-difluoro-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Tsuji *et al.*, (Tsuji, Y. *et al.*, J. Org. Chem. 55:580 (1990)). Se combinaron polvo de Zn (942 mg, 14,4 mmol), CaCl₂ (94,4 mg), H₂O (1,0 ml) y 4,0 ml de EtOH y se llevaron hasta reflujo tal como se describió para 3-fluoro-1,2-diaminobenceno (véase el ejemplo 11) y a esta mezcla se le añadió lentamente gota a gota una disolución de 4,5-difluoro-2-nitroanilina (200 mg, 1,15 mmol) en 2 ml de EtOH. El análisis y el tratamiento final fueron tal como se describió para 3-fluoro-1,2-diaminobenceno (ejemplo 11) excepto que se disolvió la reacción en 5 ml de H₂O y se extrajo la disolución con 3 x 10 ml de Et₂O. Se combinaron las fases orgánicas y se trataron con carbón activado, se secaron (MgSO₄) y se filtraron a través de un lecho de Celite. Se evaporó el disolvente a presión reducida dando 111,5 mg (67,3%) de un sólido cristalino marrón. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,34 (s a, 4H, NH₂), 6,53 (t, 2H, ArH).

6,7-Difluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título (Sarges, R. *et al.*, J. Med. Chem. 33:2240 (1990)) usando una adaptación del método de Cheeseman. (Cheeseman, G.W.H. J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (1,11 g, 7,63 mmol) y 3,4-difluoro-1,2-diaminobenceno (110 mg, 0,763 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 2 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con hexanos y se secó al aire. Se recristalizó este sólido gris marrón en 20 ml de EtOH y se recogieron los cristales de color marrón-blanco mediante filtración a vacío y se secaron los cristales adicionalmente a vacío (0,5 torr, 25°C) dando 45,3 mg (30,0%) p.f. >360°C (véase la bibliografía >310°C). ¹H RMN (d₆-acetona) δ 7,19 (t, 2H, ArH, J_{H-F} = 9,3), 10,9 (s a, 2H, NH).

Ejemplo 15

Preparación de 5,6,7,8-tetrafluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

65 2-Nitro-3,4,5,6-tetrafluoroanilina

Se preparó 2-nitro-3,4,5,6-tetrafluoroanilina usando una adaptación del método de Brooke *et al.*, J. Chem. Soc. 802 (1961). Se burbujó gas de amoníaco a través de una disolución de pentafluoronitrobenzoceno (3,00 g, 114,1 mmol) en 200 ml de dietil éter anhidro durante 4 h. Durante este tiempo el color cambió desde blanco claro hasta amarillo intenso y se formó un precipitado blanco. Se separó el precipitado (fluoruro de amonio) mediante filtración a vacío y

ES 2 313 714 T3

se lavó con éter (30 ml). Se evaporó el filtrado por rotación y los cristales naranjas resultantes dieron 3 manchas en la CCF (alúmina, benceno). Se logró la purificación de esta muestra mediante cromatografía en columna (alúmina básica, benceno). Se logró la purificación de esta muestra mediante cromatografía en columna (alúmina básica, actividad II) en una columna de 1,5" x 20". Se recogió la primera banda y se concentró dando 1,88 g de un sólido amarillo (63,0%), p.f. 44,5-45 (véase la bibliografía 42,5-43,5°C). ¹⁹F RMN (patrón externo C₆F₆, δ -162,9) δ -149,9(m), -156,6(m), -162,0 (m), -178,3(m).

3,4,5,6-Tetrafluoro-1,2-diaminobenceno

Se preparó 3,4,5,6-tetrafluoro-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Tsuji *et al.*, J. Org. Chem. 55:580 (1990). Se calentó una suspensión de polvo de Zn (1,95 g, 29,8 mmol), CaCl₂ (195 mg) y H₂O (2,3 ml) en 7 ml de EtOH hasta reflujo con agitación bajo N₂. A esto se le añadió lentamente gota a gota una disolución de 2-nitro-3,4,5,6-tetrafluoroanilina (2 g, 12,8 mmol) en 5 ml de EtOH. Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 5 h. El análisis por CCF (gel de sílice, benceno:EtOAc 2:1) indicó la desaparición completa del material de partida. Se eliminó el Zn mediante filtración a vacío y se aclaró el Zn con EtOH (30 ml). Se evaporó por rotación el disolvente y se disolvió el residuo en 20 ml de Et₂O y se lavó la disolución con 2 x 15 ml de H₂O y 15 ml de NaCl saturado. Se secó la fase orgánica (MgSO₄) y se filtró a vacío. Se evaporó por rotación el disolvente dando 396,6 mg (92,5%) de un sólido púrpura marrón, p.f. 120-125°C, que se usó sin purificación adicional.

5,6,7,8-Tetrafluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título (Allison, *et al.*, J. Fluor Chem. 1:59 (1971)) usando una adaptación del método de Cheeseman (Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (2,86 ml, 4,1 mmol) y 3,4,5,6-tetrafluoro-1,2-diaminobenceno (380 mg, 2,11 mmol) hasta reflujo con agitación bajo N₂ durante 8 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se observó una pequeña cantidad de precipitado púrpura. Se evaporó el oxalato de dietilo en exceso y se suspendió el sólido resultante en 20 ml de hexanos, se filtró a vacío y se aclaró el sólido con hexanos (20 ml) y acetato de etilo (10 ml). Se secó al aire el sólido dando 244,8 mg (49,9%). P.f. 330-331°C (véase aproximadamente 300°C desc.). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 12,33 (s a, NH). ¹⁹F RMN (patrón externo C₆F₆, δ -162,9), δ -157,7(m), -167,9(m).

Ejemplo 16

Preparación de 5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

6-Bromo-4-fluoro-2-nitroanilina

Se preparó 6-bromo-4-fluoro-2-nitroanilina usando una adaptación del método de Mitchell *et al.*, J. Org. Chem. 44:4733 (1979). A una disolución de 4-fluoro-2-nitroanilina (500 mg, 3,2 mmol) en DMF seca (16 ml) bajo N₂ se le añadió gota a gota una disolución de N-bromosuccinimida (570 mg, 3,2 mmol) en DMF seca (16 ml). Se permitió que la reacción se agitase durante 24 h. Entonces se vertió la disolución en 100 ml de H₂O y se extrajo esta fase acuosa con 4 x 25 ml de CH₂Cl₂. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con 3 x 4 ml de H₂O y se secaron (MgSO₄). Se filtró el MgSO₄ a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando un aceite marrón que cristalizó en reposo. 642 mg (85,4%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 6,51 (s a, 2H NH₂), 7,58 (dd, J_{H4-3} = 3Hz, J_{H4-F} = 6,5 Hz, H-4), 7,92 (dd, J_{H3-4} = 3 Hz, J_{H3-F} = 8,7 Hz, H-3).

1,2-Diamino-3-bromo-5-fluorobenceno

Se preparó 1,2-diamino-3-bromo-5-fluorobenceno usando una adaptación del método de Bellamy *et al.*, Tetrahedron Lett. 25:839 (1984). Se calentó una mezcla de 6-bromo-4-fluoro-2-nitroanilina (673 mg, 2,87 mmol) y SnCl₂ 2H₂O (3,23 g, 14,3 mmol) disuelta en 6 ml de acetato de etilo y 3 ml de etanol absoluto a 70°C durante 30 min. Todo el material de partida había reaccionado tal como se comprobó mediante CCF (gel de sílice, hexanos:acetato de etilo 2:1). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en 20 ml de hielo triturado. Se añadió suficiente NaHCO₃ sólido para llevar el pH hasta 7,5. Entonces se extrajo la mezcla de reacción con 3 x 20 ml de acetato de etilo y se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró a vacío y se evaporó el disolvente por rotación dando 510 mg de un líquido marrón oscuro (86,7%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,64 (s a, 4H, 2(NH₂)), 6,44 (dd, 1H, H5, J₄₋₅ = 2,7, J_{H-F} = 9,8), 6,72 (dd, 1H, H4, J₄₋₅ = 2,7, J_{HF} = 8,4).

5-Bromo-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman (Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (3,31 ml, 24,4 mmol) y 1,2-diamino-3-bromo-5-fluorobenceno (500 mg, 2,44 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 5 h. La mezcla de reacción era marrón oscuro. Se

ES 2 313 714 T3

permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH (30 ml). Se secó al aire el sólido marrón durante 1 h dando 250 mg (rendimiento bruto del 39,6%). Se retiró una porción de este sólido y se disolvió en NaOH 1 N (10 ml) y se eliminaron unas pocas partículas insolubles mediante filtración por gravedad. Se trató la disolución con carbono decolorante y se filtró la mezcla a través de un lecho de Celite y se acidificó la disolución resultante con HCl 1 N. Se formaron cristales blancos que se aislaron mediante filtración a vacío y se lavaron con agua (20 ml). Se secaron los cristales en una pistola de secado (0,05 torr, 78°C) dando 54,1 mg, p.f. 308-310°C (desc.). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 6,2 (dd, 1H, J_{H6-8} = 2,7, J_{H-F} = 9,3, ArH), 7,35 (dd, 1H, J_{H6-8} = 2,4, J_{HF} = 8,4 Hz), 11,1 (s a, 1H, NH), 12,1 (sa, 1H, NH). EI-HRMS calc. para C₈H₄BrFN₂O₂: 257,9440, hallado 257,9455.

Ejemplo 17

Preparación de 6-cloro-7-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc. 1171 (1962). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (1,83 g, 12,5 mmol) y 1,2-diamino-4-cloro-5-fluorobenceno (200 mg, 1,25 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 2 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH. Se disolvió este sólido en NaOH 1 N (20 ml) y se trató la disolución con carbón decolorante. Se filtró esta mezcla a través de un lecho de Celite y se acidificó la disolución naranja pálido resultante con HCl 4 N. Se formó un precipitado que se aisló mediante filtración a vacío y se lavó con agua. Se secó este sólido de color tostado en una pistola de secado (0,05 torr, 78°C) dando 121,7 mg (45,5%). P.f. 344-348°C (desc.) ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 6,93 (d, 1H, J_{H8-F} = 10,2 Hz, H-8), 7,08 (d, 1H, J_{H4-F} = 7,2 Hz, H-4). ¹⁹F RMN (patrón externo C₆F₆, δ -162,9) δ -124,7 (s). EI-HRMS calc. para C₈H₄ClFN₂O₂ 213,9945, hallado 213,9961.

Ejemplo 18

Preparación de 5-bromo-7-trifluorometil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc. 1171 (1962). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (1,15 g, 7,91 mmol) y 1,2-diamino-3-bromo-5-trifluorometilbenzeno (200 mg, 0,95 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 2 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH (15 ml). Se secó este sólido blanco en una pistola de secado (0,05 torr, 78°C) dando 148,3 mg (60,7%). P.f. 301-304 (desc.). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,28 (s, 1H, ArH), 7,56 (s, 1H, ArH), 11,7 (s a, 2H, NH). ¹⁹F RMN (patrón externo C₆F₆, δ -162,9) δ -57,97 (s). EI-HRMS calc. para C₉H₄BrF₃N₂O₂ 307,9408, hallado 307,9411.

Ejemplo 19

Preparación de 6-fluoro-7-nitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman (Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se disolvió 6-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (200 mg, 1,10 mmol) en 3 ml de H₂SO₄ concentrado y se enfrió la disolución azul verde hasta 0°C con agitación. A esto se le añadió KNO₃ en pequeñas porciones (110 mg, 1,10 mmol). Se permitió que la reacción se agitasen durante 1 h a 0°C y luego se permitió que llegase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Entonces se vertió la mezcla de reacción marrón-naranja en 10 ml de hielo/H₂O. Se aisló el producto mediante filtración a vacío como cristales marrones que se aclararon con una pequeña cantidad de H₂O fría y se secaron al aire. Se secaron adicionalmente los cristales a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 173,4 mg (rendimiento del 70,0%).

Se preparó una muestra analítica mediante disolución de 75 mg del producto bruto en 5 ml de NaOH 1 N y tratamiento de esta disolución con carbón activado. Se filtró esta suspensión a vacío a través de un lecho de Celite y se acidificó cuidadosamente la disolución con HCl concentrado dando cristales amarillos como precipitado. Se aislaron los cristales mediante filtración a vacío y se secaron tal como se describió anteriormente dando 38,9 de cristales amarillo brillante. P.f. 348-350 (desc.) ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 12,4 (s, 1H, NH), 12,1 (s, 1H, NH), 7,8 (d, J_{H-Fmeta} = 7,2, 1H, ArH), 7,0 (d, J_{H-Fortho} = 12, 1H, ArH). EI-EM m/z 225 (100, M+, 167 (10), 45 (41), 28 (96). EI-HRMS calc. para C₈H₄FN₃O₄ 225,0185, hallado 225,0196.

Ejemplo 20

Preparación de 6-trifluorometil-7-nitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman (Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se disolvió 6-trifluorometil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (200 mg, 0,869 mmol) en 8 ml de H₂SO₄ concentrado y se enfrió la disolución amarilla-verde hasta 0°C con agitación. A esto se le añadió KNO₃

ES 2 313 714 T3

en pequeñas porciones (87,8 mg, 1,10 mmol). Se permitió que la reacción se agitase durante 1 h a 0°C y entonces se permitió que llegase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Entonces se vertió la mezcla de reacción marrón-naranja en 10 ml de H₂O con hielo. Se aisló el producto mediante filtración a vacío como cristales amarillo pálido que se aclararon con una pequeña cantidad de H₂O fría y se secaron al aire. Se secaron adicionalmente los cristales a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 121,1 mg (rendimiento del 50,6%). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,53 (s, 1H, ArH), 7,80 (s, 1H, ArH), 12,4 (s, 2H, NH). EI-EM m/z 275 (81, M+), 217 (36), 201 (100, pb), EI-HRMS calc. para C₉H₄N₃O₄F₃ 275,0153, hallado 275,0170.

10 Ejemplo 21

Preparación de 6-sulfonil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se preparó 6-clorosulfonil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona usando una adaptación del método de Keana *et al.* (J. Org. Chem. 48:3654 (1983)). A 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (1,0 g, 6,2 mmol) se le añadieron todo de una vez 3,0 ml de ácido clorosulfónico. Se agitó la mezcla bajo N₂ a 60°C durante 2 h, se permitió que llegase hasta la temperatura ambiente y se añadió la disolución lentamente gota a gota a 25 ml de hielo triturado. Se filtró el sólido resultante a vacío y se aclaró con hielo/H₂O. Se secó adicionalmente el sólido blanco a 0,5 torr (25°C) sobre CaSO₄ dando 1,1 g (68%). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 7,07 (d, J₇₋₈ = 8,1, 1H, H8), 7,29 (dd, J₇₋₈ = 8,1, J₆₋₇ = 1,0, 1H, H7), 7,40 (d, J₅₋₇ = 1,0, 1H, H5). EI-EM m/z 262 (M+2, 15), 260 (M+, 40), 225 (35), 105 (43), 36 (100, pb). EI-HRMS calc. para C₈H₅ClN₂O₄S 259,9687, hallado 259,9645.

6-Sulfonil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó 6-sulfonil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona usando una adaptación del método de Keana *et al.* (J. Org. Chem. 48:3654 (1983)). Se agitó una suspensión de 6-clorosulfonil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalina (142,7 mg, 0,546 mmol) en 5,0 ml de H₂O a 50°C durante 8 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se secó adicionalmente el sólido resultante a vacío (0,5 torr, 50°C) dando 121,6 mg de un sólido naranja pálido pulverulento (91,8%). ¹H RMN (D₂O) 7,2 (m a, 2H, ArH), 7,5 (m a, 1H, ArH). EI-EM m/z 242 (M+, 5), 162 (37), 106 (100), 80 (89).

Ejemplo 22

Preparación de 6-sulfonamida-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

A 6-clorosulfonil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (200 mg, 0,770 mmol) se le añadieron todo de una vez 2 ml de NH₄OH conc. Se calentó suavemente la mezcla en un baño de vapor con agitación ocasional. A medida que la disolución se calentaba, se formó un precipitado blanco. Se calentó la disolución durante 20 min. y se enfrió hasta temperatura ambiente y se acidificó la mezcla con HCl 1 N. Se recogió el sólido mediante filtración a vacío y luego se aclaró con H₂O fría. Se secó adicionalmente el sólido a vacío (0,5 torr, 25°C) dando 98,2 mg (53,0%) que era puro a >95% mediante ¹H RMN. Se preparó una muestra analítica mediante disolución de 45 mg del sólido en 1 ml de NaOH 1 N seguido por acidificación de la disolución con HCl 1 N. La sulfonamida precipitó como agujas amarillo pálido que se aislaron mediante filtración a vacío, se aclararon con H₂O fría y se secaron a vacío (0,5 torr, 25°C) dando 28,9 mg. ¹H RMN (d₆-DMSO) 7,20 (d, J₇₋₈ = 8,4, 1H, H8), 7,34 (s, 2H, NH₂), 7,50 (dd, J₇₋₅ = 1,8, J₇₋₈ = 8,4, 1H, H7), 7,56 (d, J₅₋₇ = 1,8, 1H, H5), 12,14 (s, 1H, NH), 12,11 (s, 1H, NH). EI-EM m/z 241 (M+, 83), 133 (63), 105 (pb, 100), 64 (75), 28 (80). EI-HRMS calc. para C₈H₇N₃O₄S 241,0156, hallado 241,0139.

50 Ejemplo 23

Preparación de 6-(N-propilsulfonil)-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Adams *et al.* (J. Am. Chem. Soc. 73: 1147 (1951)). A una mezcla de *n*-propilamina (50 mg, 0,846 mmol) en 0,5 ml de piridina a 0°C se le añadió en pequeñas porciones 6-clorosulfonil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (100 mg, 0,385 mmol). Se permitió que la disolución se calentase hasta temperatura ambiente y se agitó durante 8 h bajo N₂. Se vertió la mezcla de reacción en una mezcla de 5 ml de H₂O:HCl conc. 1:1 y 3 g de hielo. Comenzaron a formarse cristales tras 1 h y se permitió que la disolución reposara durante la noche. Se aislaron los cristales mediante filtración a vacío agujas amarillo pálido, se aclararon con H₂O fría y se secaron adicionalmente a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 47,5 mg (44,1%). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 0,74 (t, 3H, CH₃), 1,32 (m, 2H, CH₂), 2,62 (m, 2H, CH₂), 7,20 (d, J = 8,4, 1H, H7), 7,42 (d, J = 7,4, 1H, H5), 7,50 (m, 2H, NH, H6), 12,07 (s, 1H, NH), 12,14 (s, 1H, NH).

65

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 24

Preparación de 6-(*N,N*-dimetilsulfonil)-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

5 Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Adams *et al.* (J. Am. Chem. Soc. 73: 1147 (1951)). A una mezcla de dimetilamina (disolución al 40%, 52,2 mg, 131 μ l, 1,16 mmol) y 0,5 ml de piridina a 0°C se le añadió en pequeñas porciones 6-clorosulfonil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (100 mg, 0,385 mmol). Se permitió que la disolución se calentase hasta temperatura ambiente y se agitó durante 8 h bajo N₂. Se vertió la mezcla de reacción en una mezcla de 5 ml de H₂O:HCl conc. 1:1 y 3 g de hielo. Comenzaron a formarse cristales tras 1 h y se permitió que la disolución reposara durante la noche. Se aislaron los cristales mediante filtración a vacío como agujas blancas, se aclararon con H₂O fría y se secaron adicionalmente a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 44,2 mg (42,6%). ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 2,57 (s, 6H, CH₃), 7,28 (d, J₇₋₈ = 8,4, 1H, H₈), 7,44 (dd, J = 8,7, J = 1,8, 2H H₅, H₇), 12,03 (s, 1H, NH), 12,22 (s, 1H, NH). EI-EM m/z 269 (M +, 83), 225 (26), 161 (pb, 100), 106 (94).

15 Ejemplo 25

Preparación de *N*-metil-6,7-dinitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

20 *N*-Metil-1,2-diaminobenceno

Se preparó *N*-metil-1,2-diaminobenceno usando una adaptación del método de Tsuji *et al.* (J. Org. Chem. 55:580 (1990)). Se combinaron polvo de Zn (8,07 g, 0,123 mol), CaCl₂ (807 mg), H₂O (9,9 ml) y 30 ml de EtOH y se llevaron hasta reflujo tal como se describió para 3-fluoro-1,2-diaminobenceno (véase el ejemplo 10), y a esta mezcla se le añadió lentamente gota a gota una disolución de *N*-metil-2-nitroanilina (1,50 g, 9,86 mmol) en 15 ml de EtOH. El análisis y el tratamiento final fueron tal como se describió para 3-fluoro-1,2-diaminobenceno excepto que se disolvió el residuo de la reacción en 50 ml de Et₂O. Entonces se extrajo esta disolución de Et₂O con 3 x 25 ml de HCl 1 N y se combinaron las fases acuosas y se basificaron con 5 g de disolución de NaOH al 50%. Entonces se extrajo esta disolución con 3 x 25 ml de Et₂O. Entonces se combinaron estas fases de Et₂O, se secaron (MgSO₄) y se evaporó el disolvente a presión reducida dando 911,1 mg (76,1%) de un aceite marrón oscuro. ¹H RMN (CDCl₃) δ 2,87 (s, 3H, CH₃), 3,31 (s a, 3H, NH), 6,67 (m, 3H, ArH), 6,86 (m, 1H, ArH).

35 *N*-Metil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó *N*-metil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona usando una adaptación del método de Cheeseman (J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (3,23 g, 22,1 mmol) y *N*-metil-1,2-diaminobenceno (332 mg, 2,72 mmol) hasta reflujo bajo N₂ durante 2 h. Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH. Se secó adicionalmente el sólido gris marrón a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 274,3 mg (57,2%). Se purificó adicionalmente una porción de este sólido mediante recristalización en 50 ml de EtOH y tratamiento con carbón activado dando cristales amarillo pálido esponjosos que se recogieron mediante filtración a vacío y se aclararon con EtOH frío dando 104,9 mg. ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 3,50 (s, 3H, CH₃), 7,16 (m, 3H, ArH), 7,36 (m, 1H, ArH), 12,01 (s, 1H, NH). EI-EM 176 (M+, 52), 148 (33), 119 (100, pb).

45 *N*-Metil-6,7-dinitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman (J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se disolvió *N*-metil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (200 mg, 1,13 mmol) en 3 ml de H₂SO₄ concentrado y se enfrió la disolución azul verde hasta 0°C con agitación. A esto se le añadió KNO₃ en pequeñas porciones (228 mg, 2,26 mmol). Se permitió que la disolución naranja oscuro se agitate durante 1 h a 0°C y entonces se permitió que llegase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Entonces se vertió la mezcla de reacción marrón naranja en 10 ml de H₂O con hielo. Se aisló el producto mediante filtración a vacío como un sólido amarillo blanco que se aclaró con 10 ml de H₂O fría y se secó al aire. Se secaron adicionalmente los cristales a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 220 mg (72,0%). Se preparó una muestra analítica mediante recristalización de 120 mg de la muestra bruta en ácido acético glacial. Se recogieron los cristales resultantes mediante filtración a vacío y se aclararon con H₂O y se secaron a vacío (0,1 torr, 60°C) dando 34,2 mg de cristales amarillos. ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 3,52 (s, 3H, CH₃), 7,80 (s, 1H, ArH), 8,10 (s, 1H, ArH), 12,6 (s, 1H, NH).

60 Ejemplo 26

Preparación de 2,3-(4*N*)-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

65 Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman (J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (6,22 ml, 45,5 mmol) y 1,2-diaminopiridina (500 mg, 4,58 mmol) hasta reflujo con agitación bajo N₂ durante 2 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido

ES 2 313 714 T3

mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH (20 ml) dando un sólido amarillo-blanco que se secó adicionalmente a vacío (0,1 torr, 25°C) dando 693 mg (93,0%). ^1H RMN (d_6 -DMSO) δ 7,11 (dd, 1H, H-7), 7,43 (dd, 1H, J = 8,1 Hz, 1,2 Hz, H-8), 8,05 (dd, 1H, J = 5,1 Hz, J = 1,2 Hz, H-6).

5 Ejemplo 27

Preparación de 2,3,6,8-tetraceto-5,6-dimetilpteridina (compuesto de referencia)

10 Se preparó el compuesto del título usando una adaptación del método de Cheeseman (J. Chem. Soc. 1171 (1962)). Se calentó una mezcla de oxalato de dietilo (1,75 ml, 12,8 mmol) y 5,6-diamino-1,3-dimetiluracilo hidratado (200 mg, 1,18 mmol) hasta reflujo con agitación bajo N_2 durante 8 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se recogió el sólido mediante filtración a vacío y se aclaró con EtOH (10 ml) dando un sólido amarillo que se secó al
15 a >98% mediante RMN. Se disolvió una porción de este sólido (100 mg) en NaOH 1,0 N (5 ml). La acidificación de esta disolución con HCl 6 N dio un sólido amarillo brillante que se recogió mediante filtración a vacío, se aclaró con H_2O (10 ml) y se secó en una pistola de secado (0,05 torr, 78°C) dando 42,4 mg. ^1H RMN (d_6 -DMSO) δ 3,20 (s, 6H, CH_3), 11,59 (s a, 2H, NH). P.f. 370-372 (desc.), EI-EM m/z 224 (100, M +), 196 (80).

20 En los siguientes ejemplos 28-44, se usaron los reactivos tal como se recibieron a menos que se indique lo contrario. Se tomaron los puntos de fusión en un aparato de punto de fusión Mel-Temp y no están corregidos. Se colocaron las muestras en el bloque cuando la temperatura era > 250°C con el fin de minimizar la descomposición antes de la fusión. Se realizó la cromatografía en columna en el modo ultrarrápido en gel de sílice Davisil (de 200-425 de malla), a menos que se indique lo contrario. Se realizó la cromatografía en capa fina analítica sobre placas de gel de sílice
25 60 F₂₅₄ soportado en aluminio y se efectuó la visualización con una lámpara ultravioleta. Se registraron los espectros de ^1H RMN en un aparato QE-300 de General Electric a 300 MHz; se notificaron los desplazamientos químicos en unidades delta en referencia a señales de protones residuales de los disolventes deuterados (CHCl_3 , δ 7,26; CHD_2OD , δ 3,30; $\text{CD}_3\text{SOCD}_2\text{H}$, δ 2,49; $\text{CD}_3\text{COCD}_2\text{H}$, δ 2,04). Se ejecutaron los espectros de ^{13}C RMN a 75 MHz. Se obtuvieron los espectros infrarrojos en un espectrómetro Nicolet 5DXB FT-IR. Se registraron las absorciones en números de onda
30 (cm^{-1}) y se indica la intensidad de las absorciones mediante las letras *s* (fuerte), *m* (media) y *w* (débil). Se registraron los espectros de masas en un espectrómetro de masas VG ZAB-2-HF con un sistema de datos VG-11-250, en el modo de ionización electrónica (70 eV) a menos que se indique lo contrario. Los microanálisis se realizaron por Desert Analytics de Tuscon, Arizona.

35 Ejemplo 28

Preparación de 1-amino-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

40 Se adaptó el procedimiento de Wallace, R.G., Org. Prep. Proc. Int. 14:269 (1982). A una suspensión agitada de 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (162 mg, 1,00 mmol, Aldrich) en agua destilada (4 ml) a 25°C se le añadió NaOH (100 mg, 2,5 mmol). Tras 5 min., se trató la disolución resultante en porciones a lo largo de 10 min. con ácido hidroxilamino-*o*-sulfónico (113 mg, 1,00 mmol, Aldrich). Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente. Apareció un precipitado tras 1 h, se agitó de manera continua durante otra hora, se recogió para conseguir 70 mg (40%) de 1-
45 amino-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona bruta (base libre Na^+ , razón de material de partida con respecto a producto = 5:95 mediante RMN, D_2O). Se acidificó el filtrado hasta pH = 2 mediante HCl 1 N (~1,5 ml), dando 50 mg de un precipitado blanco, que era una mezcla 1:1 de 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona y la sal clorhidrato de 1-amino-2,3-quinoxalindiona (mediante RMN, DMSO). El rendimiento total de 1-amino-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es del 51%.

50 Se disolvió una muestra de 70 mg de la 1-amino-2,3-quinoxalindiona bruta en agua destilada (5 ml) y entonces se acidificó hasta pH = 5 con AcOH y entonces se permitió que la disolución reposara a 25°C durante un día, dando agujas blancas. Se recogieron los cristales mediante filtración y entonces se lavaron con agua destilada (2 x 2 ml) seguido por etanol (2 x 1 ml) dando 61 mg (34,5%) de 1-amino-2,3-quinoxalindiona pura (base libre H) como agujas blancas; p.f.:
55 226-8°C (sublimación); 260-2°C (desc.) (véase, Shin, S.C. y Lee, Y.Y. Taehan Hwahakhoe Chi 27(5):382-4 (1983), sublimación a 228°C). IR (KBr, cm^{-1}): 3306, 1687, 1631, 1587. RMN (^1H , DMSO- d_6): δ 5,880 (s, 2H); 7,143 (m, 3H); 7,601 (d, 1H); 12,061 (s, 1H). HR-EM, calcd. para $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ (M+) m/z: 177,0537; hallado: 177,0536.

60 Ejemplo 29

Preparación de 1-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

65 Se adaptó el procedimiento de Wallace, R.G., Org. Prep. Proc. Int. 14:269 (1982). A una suspensión agitada de 6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (189 mg, 0,82 mmol) en agua destilada (15 ml) a 60°C se le añadió NaOH (335 mg, 8,37 mmol). Tras 30 min. se trató la disolución resultante en porciones a lo largo de 10 min. con ácido hidroxilamino-*o*-sulfónico (111 mg, 0,98 mmol, Aldrich). Se llevó a cabo la reacción a 60°C. Apareció un precipitado blanco tras 10 min. Se agitó la mezcla a 25°C durante 8 h, se recogió mediante filtración a 50°C, produciendo 180

ES 2 313 714 T3

mg (90%) de 1-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta, como un sólido amorfo blanco (razón de material de partida con respecto a producto = 10:90 mediante ^1H RMN, D_2O). El rendimiento es del 81%. Se suspendió una muestra de 109 mg de la 1-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (base libre Na^+ , 0,445 mmol) en NaOH 1 N (10 ml) a 50°C durante 30 min. y se recogió mediante filtración. Se disolvió el precipitado (87 mg) en agua destilada caliente (80 ml) y se eliminó el material insoluble mediante filtración. Entonces se acidificó el filtrado con AcOH hasta $\text{pH} = 5$. Se calentó la suspensión resultante a $60\text{--}70^\circ\text{C}$ para lograr una disolución transparente y luego se enfrió lentamente hasta 25°C , dando agujas blancas. Se recogieron los cristales mediante filtración y luego se lavaron con agua destilada (2 x 2 ml) seguido por etanol (2 x 1 ml), se secó mediante rotavapor a 60°C durante 4 h, dando 73 mg (84%) de 1-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (base libre H). Entonces se midió el p.f. El color de la 1-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona cambió a amarillo a 335°C ; la descomposición de la 1-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona es obvia a 340°C y se fundió dando un líquido negro a $343\text{--}5^\circ\text{C}$. IR (KBr, cm^{-1}): 3337; 3225; 3056; 1706; 1668; 1581. RMN (^1H , DMSO-d_6): δ 5,791 (s, 2H); 7,271 (s, 1H); 7,721 (s, 1H); 12,115 (s, 1H). HR-EM: calc. para $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2\text{Cl}_2$ (M^+) m/z : 244,9756; hallado: 244,9767.

15

Ejemplo 30

Preparación de 1-acetamido-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

20

Se agitó una mezcla de 1-amino-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (53 mg, 0,30 mmol) y piridina (1 ml, recién destilada a partir de KOH antes de su uso) y anhídrido acético (1 ml, Aldrich) bajo nitrógeno a 60°C durante 4 h. La mezcla de reacción se volvió una disolución transparente. Entonces se evaporaron todo el disolvente y reactivo a presión reducida y se lavaron con benceno:ciclohexano = 1:1 (2 x 2 ml); éter (2 x 2 ml), se secó a 60°C con rotavapor durante 2 h, produciendo 57 mg (86%) de 1-acetamido-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura como un polvo blanco; p.f.: $211\text{--}213^\circ\text{C}$. IR (KBr, cm^{-1}): 3430; 3127; 1741; 1717; 1668. RMN (^1H , DMSO-d_6): δ : 2,326 (s, 3H); 7,121-7,287 (m, 4H); 12,345 (s, 1H). Masa: calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ (M^+) m/z : 219,0641; hallado: 219,0651.

Ejemplo 31

*Preparación de 1-[[*o*-tolilamino]carbonil]amino]-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)*

Se adaptó el procedimiento de Leeson, P.D. *et al.*, J. Med. Chem 35:1954-68 (1992). Se agitó una suspensión de 1-amino-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (37 mg, 0,21 mmol) en piridina (2,5 ml) a 70°C hasta que se finalizó la disolución. Entonces se añadió a la disolución isocianato de *o*-tolilo (27,8 mg, 0,21 mMol, Aldrich), que se agitó a 60°C durante 2 h, luego durante la noche a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente a presión reducida, se lavó el residuo con éter (2 x 2 ml) dando 59 mg de 1-[[*o*-tolilamino]carbonil]amino]-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (66% de producto; 30% de subproducto de toliilo; 4% de 1-amino-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona mediante ^1H RMN). Se separó mediante cromatografía con columna de gel de sílice (2 g), se eluyó con el 100% de benceno (20 ml) y benceno:acetona = 1:1 (20 ml) y el 100% de acetona (20 ml) para eliminar la mayor parte de la impureza. Se lavó el residuo (43 mg de 1-[[*o*-tolilamino]carbonil]amino]-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona) con etanol (2 x 2 ml) y éter (2 x 1 ml) dando 38 mg de 1-[[*o*-tolilamino]carbonil]amino]-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura como un polvo blanco (60%). P.f.: descomposición a partir de 265°C . IR (KBr, cm^{-1}): 3375; 3237; 1718; 1693; 1675. RMN (^1H , DMSO-d_6) δ 2,161 (s, 3H); 6,996-7,380 (m, 8H); 8,530 (s, 1H), 9,343 (s, 1H); 12,155 (s, 1H).

Ejemplo 32

Preparación de 1-amino-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

6,7-Dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (método A): Se adaptó el procedimiento de Jorgenson, A.K. *et al.*, publicación de solicitud de patente internacional número WO91/13878 y Chem. Abstr. 115(25):280059u (1991). A una suspensión agitada de 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (1,62 g, 10,00 mmol, Aldrich) y Ag_2SO_4 (3,43 g, 11,00 mmol) en H_2SO_4 concentrado (10 ml) a TA se le añadió bromo (3,52 g, \sim 1,13 ml, 22,00 mmol) a lo largo de 30 min. Entonces se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h. Entonces se añadió tetraclorometano (10 ml) y se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 2 h. Se eliminó el material insoluble mediante filtración, se vertió el filtrado en agua con hielo (200 ml) y se recogió el sólido amarillo separado mediante filtración y se secó al aire. Se disolvió la 6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona bruta en NaOH 1 N (20 ml) y agua (20 ml), y se eliminó el precipitado amarillo mediante filtración. Se acidificó el filtrado con HCl 4 N hasta $\text{pH} = 2$ dando un precipitado blanco, que se lavó con agua destilada (2 x 2 ml) y etanol (2 x 1 ml), produciendo 1,082 de 6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona como un polvo fino gris (95% de pureza mediante RMN). Segunda cosecha del precipitado amarillo con el procedimiento anterior, dando 927 mg de 6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. El rendimiento total es del 65%. La cristalización en $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ proporcionó microcristales blancos (recuperado el 85%). P.f.: descompuesto a partir de 335°C . IR (KBr, cm^{-1}): 3200; 1718; 1693. RMN (^1H , DMSO-d_6): δ 7,336 (s, 2H); 11,962 (s, 2H). HRMS: calc. para $\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}_2$ (M^+) m/z : 317,8639, hallado: 317,8619.

65

ES 2 313 714 T3

6,7-Dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (método B): Se adaptó el procedimiento de Mitchell, R.H. *et al.*, J. Org. Chem. 44(25):4733 (1979). A una suspensión agitada de 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (3,24 g, 20,00 mmol, Aldrich) en DMF anhidra (100 ml) se le añadió N-bromosuccinimida (14,24 g, 80,00 mmol, Aldrich) y se agitó la mezcla a 25°C durante 0,5 h dando una disolución amarillo claro. Se llevó a cabo la reacción de manera continua a 25°C durante 24 h dando un precipitado blanco, que se recogió mediante filtración y luego se lavó con agua destilada (2 x 1 ml) seguido por etanol al 95% (2 x 2 ml) produciendo 2,216 g de 6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (mediante RMN) como un polvo blanco. Se vertió el filtrado en 200 ml de agua con hielo y se recogió el precipitado mediante filtración, luego se lavó con agua destilada (2 x 2 ml) seguido por etanol al 95% (2 x 2 ml) produciendo 3,627 g de 6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (con el 1% de impureza mediante RMN) que se disolvió en NaOH 1 N (50 ml) y luego se acidificó hasta pH = 2 con HCl 4 N dando un precipitado color crema blanco. Se recogió el precipitado mediante filtración y se lavó con agua destilada (2 x 2 ml) seguido por etanol al 95% (2 x 2 ml) y se secó al aire a 50°C durante 8 h, dando 3,517 g (rendimiento total del 89%) de 6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (mediante RMN) como un polvo blanco. La recristalización en DMSO/H₂O proporcionó microcristales blancos. Se midió el p.f. de 5,6-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona: descompuesto a partir de 335°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3200, 1718, 1693. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,336 (s, 2H); 11,962 (s, 2H). HRMS: calc. para C₈H₄Br₂N₂O₂ (M⁺) m/z: 317,8639 hallado: 317,8619.

6,7-Dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (método C): A una suspensión agitada de 1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (550 mg, 3,39 mmol, Aldrich) en DMF anhidra (10 ml) se le añadió gota a gota una disolución de bromo (1,07 g, 6,77 mmol, Aldrich) en DMF anhidra (0,5 ml) en el plazo de 1 h y luego se agitó la reacción a 25°C durante 30 h. Entonces, se añadió tetraclorometano (10 ml) y se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 2 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua con hielo (50 ml) y se recogió el precipitado mediante filtración y se lavó con agua destilada (2 x 1 ml) seguido por etanol al 95% (2 x 1 ml) produciendo 6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (con el 1% de impureza mediante RMN) como un polvo blanco. Se disolvió el producto bruto en NaOH 1 N (10 ml) y luego se acidificó hasta pH = 2 con HCl 4 N dando un precipitado color crema blanco. Se recogió el precipitado mediante filtración y se lavó con agua destilada (2 x 1 ml) seguido por etanol al 95% (2 x 1 ml) y se secó al aire a 50°C durante 8 h, dando 770 mg (rendimiento del 72%) de 6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (mediante RMN) como un polvo blanco. La recristalización en DMSO/H₂O proporcionó microcristales blancos. Se midió el p.f. de 6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona: descompuesto a partir de 335°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3200, 1718, 1693. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,336 (s, 2H); 11,962 (s, 2H). HRMS: calc. para C₈H₄Br₂N₂O₂ (M⁺) m/z: 317,8639 hallado: 317,8619.

1-Amino-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se adaptó el procedimiento de Wallace, R.G., Org. Prep. Proc. Int. 14:269 (1982). A una suspensión agitada de 6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (100 mg, 0,312 mmol) en agua destilada (10 ml) a 60°C se le añadió NaOH (400 mg, 10 mmol). Tras 30 min., se trató la disolución resultante gota a gota a lo largo de 10 min. con ácido hidroxilamino-o-sulfónico (40 mg, 0,35 mmol, Aldrich) en agua (0,5 ml). Se llevó a cabo la reacción a 60°C. Apareció un precipitado blanco tras 15 min. Se agitó la mezcla a 60°C durante 1 h. Se recogió el precipitado blanco mediante filtración y se lavó con agua destilada (2 x 2 ml) y etanol (2 x 1 ml), produciendo 72 mg (68%) de 1-amino-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona como un polvo blanco tras secar a 60°C durante 2 h. La acidificación del filtrado con HCl 4 N dio 35 mg de una mezcla que consistía en el 25% de 1-amino-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y el 75% de 6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona mediante RMN. Se disolvió la muestra de 72 mg de 6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona bruta en agua destilada (15 ml) a 60°C, se filtró para eliminar el material insoluble y se acidificó el filtrado con AcOH hasta pH = 5 dando un precipitado blanco, que se recogió mediante filtración y se lavó con agua destilada (2 x 2 ml) seguido por etanol (2 x 1 ml). Se secó el sólido en un rotavapor a 60°C durante 2 h produciendo 43 mg de 1-amino-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona pura como un polvo blanco; p.f.: 335-338°C (desc.). IR (KBr, cm⁻¹): 3337; 3212; 3062; 1706; 1668; 1575. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 5,784 (s, 2H); 7,391 (s, 1H); 7,841 (s, 1H); 12,158 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₅N₃O₂Br₂ (M⁺) m/z: 332,8746; hallado: 332,8741.

50 Ejemplo 33

Preparación de 5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

Se adaptó el procedimiento de Cheeseman, G.W.H., J. Chem. Soc. 1170 (1962). A una suspensión agitada de 6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (576 mg, 1,8 mmol) en H₂SO₄ concentrado (6 ml) a 0°C durante 30 min. se le añadió KNO₃ (220 mg, 2,18 mmol, Baker) en una porción. Se agitó la mezcla a 0°C durante 3 h luego a temperatura ambiente durante un día. Se cambió el color de la mezcla de rojo a amarillo marrón. Entonces se vertió en hielo (60 g) dando como resultado la separación de un precipitado amarillo brillante, que se recogió mediante filtración y se lavó con agua destilada (2 x 2 ml) seguido por etanol (2 x 1 ml) obteniendo 498 mg de 5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (76%, contiene impurezas secundarias mediante RMN). La cristalización en DMSO/H₂O dio 5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura como microcristales amarillo brillante; p.f.: 352-354°C (desc.). IR (KBr, cm⁻¹): 3387; 3256; 1756; 1700; 1537. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,475 (s, 1H); 12,217 (s, 1H); 12,265 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₃N₃O₄Br₂ (M⁺) m/z: 362,8489; hallado: 362,8509.

65

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 34

Preparación de 1-amino-5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

5 Se adaptó el procedimiento de Shin, S.C. y Lee, Y.Y., Taehan Hwahakhoe Chi 27(5):382-4 (1983). Se añadió gota a gota una disolución roja de 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (100 mg, 0,36 mmol, Cheeseman, citado anteriormente) y KOH 3 N (2 ml) en agua destilada (5 ml) a 65°C a una disolución incolora de NH₂OSO₃H (75 mg, 0,66 mmol, Aldrich) en agua destilada (0,5 ml) con agitación. Apareció un precipitado amarillo tras 10 min. Se agitó la mezcla a 65°C durante 1 h y se permitió que reposara a temperatura ambiente durante la noche, luego se
10 recogió el precipitado mediante filtración a 50°C y se lavó con agua destilada (2 ml), luego se secó a 50°C durante la noche, produciendo 85 mg (80%) de 1-amino-5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta, como un sólido amorfo amarillo (el 80% de la 1-amino-5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona deseada con el 20% de material de partida mediante RMN). Se disolvió una muestra de 85 mg de 1-amino-5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (base libre Na⁺, 0,293 mmol) en agua destilada (10 ml) a 50°C, luego se acidificó
15 con AcOH hasta pH = 5. Tras la eliminación del material insoluble mediante filtración, se calentó la mezcla a 60-70°C hasta que se obtuvo una disolución transparente, que se enfrió lentamente, tras lo que apareció un precipitado amarillo. Se cristalizó el precipitado en EtOH caliente y se recogieron los microcristales amarillos mediante filtración, se lavaron con etanol frío (2 ml) y se secaron al aire a 60°C durante 4 h, produciendo 31 mg (29%) de 1-amino-5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura. Se midió el p.f.: el color de 1-amino-5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona cambió a amarillo oscuro a 275°C; la descomposición de 1-amino-5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona es obvia a 280°C y fundió dando un líquido negro a 290-1°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3442; 3315; 3231; 1747; 1723; 1680; 1632; 1547. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 5,848 (s, 2H); 7,951 (s, 1H); 12,595 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₄N₄O₄Cl₂ (M⁺) m/z: 289,9623; hallado 289,9616.

25

Ejemplo 35

Preparación de 1(o 4)-amino-5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

30 Se adaptó el procedimiento de Shin, S.C. y Lee, Y.Y., Taehan Hwahakhoe Chi 27(5):382-4 (1983). A una disolución roja agitada de 5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (120 mg, 0,33 mmol) y KOH 3 N (2 ml) en agua destilada (5 ml) a 65°C se le añadió gota a gota una disolución incolora de NH₂OSO₃H (56 mg, 0,50 mmol) en agua destilada (0,5 ml) con agitación, después de lo cual apareció un precipitado amarillo tras 5 min. Se agitó la mezcla a 65°C durante 1 h y se permitió que reposara a temperatura ambiente durante la noche, entonces se recogió
35 el precipitado mediante filtración a 50°C, se lavó con agua destilada (2 ml), luego se secó al aire a 50°C durante la noche, produciendo 80 mg (64%) de 1-amino-5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (base libre Na⁺ mediante RMN, D₂O), como un sólido amorfo amarillo (el 80% de la 1-amino-5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona deseada con el 20% de material de partida mediante RMN). (No se sabe si la reacción realmente dio el isómero de 1-amino o 4-amino.) Se disolvió una muestra de 80 mg de 1(4)-amino-5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (0,211 mmol) en agua destilada (10 ml) a 50°C, luego se acidificó con AcOH hasta
40 pH = 5. Tras retirar el material insoluble mediante filtración, se calentó a 60-70°C hasta que se obtuvo una disolución transparente, luego se enfrió lentamente y apareció un precipitado amarillo. Se cristalizó el precipitado en EtOH caliente, se recogió mediante filtración y se lavó con etanol frío (2 ml), luego se secó al aire a 60°C durante 4 h, produciendo 57 mg (45,6%) de 1(4)-amino-5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (base libre H). Se añadió NH₂OSO₃H (40 mg, 0,35 mmol) a la disolución madre, y se dejó reaccionar a 65-70°C durante 30 min. dando una segunda cosecha de 1(4)-amino-5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (26 mg, 21%), usando el mismo procedimiento que anteriormente. El rendimiento total es del 66%. Se midió el p.f.: el color de 1(4)-amino-5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona cambió a amarillo oscuro a 301°C; la descomposición de 1(4)-amino-5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona es obvia a 310°C y se fundió dando un líquido negro
50 a 320-1°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3414; 3211; 1745; 1728; 1682; 1631; 1546. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 5,832 (s, 2H); 8,047 (s, 1H); 12,565 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₄N₄O₄Br₂ (M⁺) m/z: 377,8613; hallado: 377,8583.

Ejemplo 36

55

Preparación de 6-nitro-5,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se adaptó el método de Cheeseman, citado anteriormente. Se disolvió 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (239 mg, 1,03 mmol) en H₂SO₄ concentrado (3 ml) a 0°C durante 30 min., y se añadió KNO₃ (125,3 mg, 1,24 mmol, Baker) a esta disolución. Se agitó la mezcla a 0°C durante 3 h y luego se agitó a temperatura ambiente durante 30 h. Entonces se vertió en agua con hielo (15 g). Apareció un precipitado y se recogió mediante filtración, se disolvió en KOH 1 N (10 ml) y se retiró el precipitado rojo mediante filtración. Luego se acidificó la disolución hasta pH = 2 con HCl 4 N dando un precipitado color crema, que se recogió mediante filtración, luego se secó al aire a 50°C durante 4 h produciendo la 6-nitro-5,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (231 mg, 80%), como microcristales
65 amarillos. P.f.: 320-25°C (desc. a partir de 290°C). IR (KBr, cm⁻¹): 3467, 3140, 3055, 2946, 1717, 1693, 1541. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,221 (s, 1H), 11,932 (s, 1H), 12,312 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₃N₃O₄Cl₂ (M⁺) m/z: 274,9499, hallado: 274,9509.

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 37

Preparación de 6-nitro-5,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

5 Se adaptó el método de Cheeseman, citado anteriormente. Se disolvió 5,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (74 mg, 0,23 mmol) en H₂SO₄ concentrado (1 ml) a 0°C durante 30 min., y luego se añadió KNO₃ (28 mg, 0,27 mmol, Baker) a esta disolución. Se agitó la mezcla a 0°C durante 3 h y luego a temperatura ambiente durante 30 h. Se vertió en agua con hielo (8 g) y se recogió el precipitado mediante filtración, se disolvió en KOH 1 N (5 ml) y se eliminó el precipitado rojo mediante filtración. Luego se acidificó la disolución hasta pH = 2 con HCl 4 N obteniendo un precipitado color crema, que se recogió mediante filtración, luego se secó al aire a 50°C durante 4 h, produciendo la 6-nitro-5,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (71 mg, 84,5%), como un polvo amarillo; p.f.: 318-20°C (desc.). IR (KBr, cm⁻¹): 3468, 3131, 3062, 2931, 1712, 1593, 1537. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,392 (s, 1H), 11,566 (s, 1H), 12,274 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₃N₃O₄Br₂ m/z: 362,8489, hallado: 362,8478.

15 Ejemplo 38

Preparación de 5-cloro-6-nitro-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

20 Se adaptó el método de Cheeseman, citado anteriormente. Se disolvió 5-cloro-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (30 mg, 0,14 mmol) en H₂SO₄ concentrado (0,5 ml) a 0°C durante 30 min., y se añadió KNO₃ (17 mg, 0,17 mmol, Baker) en una porción a esta disolución. Se agitó la mezcla a 0°C durante 3 h, luego a temperatura ambiente durante 30 h. Se vertió en agua con hielo (5 g) y se recogió el precipitado mediante filtración. Se disolvió el precipitado en NaOH 1 N (5 ml), luego se acidificó hasta pH = 2 con HCl 4 N dando un precipitado color crema, que se recogió mediante filtración, luego se secó al aire a 50°C durante 4 h, produciendo el compuesto del título puro (mediante RMN) 5-cloro-6-nitro-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (31 mg, 85,4%), como un sólido amorfo blanco. P.f.: descompuesto a partir de 280°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3600, 3462, 3131, 1712, 1612, 1550. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,106 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 11,800 (s, 1H), 12,371 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₃N₃O₄ClF (M+) m/z: 258,9795, hallado: 258,9790.

30 Ejemplo 39

Preparación de 5-bromo-6-nitro-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

35 Se adaptó el método de Cheeseman, citado anteriormente. Se disolvió 5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (77 mg, 0,30 mmol) en H₂SO₄ concentrado (1 ml) a 0°C durante 30 min., y se añadió KNO₃ (35 mg, 0,346 mmol, Baker) a esta disolución. Se agitó la mezcla a 0°C durante 3 h y luego a temperatura ambiente durante 30 h. Se vertió la mezcla en agua con hielo (10 g) y se recogió el precipitado mediante filtración. Se disolvió el precipitado en NaOH 1 N (10 ml), luego se acidificó hasta pH = 2 con HCl 4 N dando un precipitado color crema, que se recogió mediante filtración, y se secó al aire a 50°C durante 4 h produciendo 5-bromo-6-nitro-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (mediante RMN) (81 mg, 90%), como un sólido amorfo blanco; p.f.: 320-25°C (desc. a partir de 290°C). IR (KBr, cm⁻¹): 3416, 3071, 2952, 1721, 1609, 1546. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,146 (d, J=10,2 Hz, 1H), 11,432 (s, 1H), 12,340 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₃N₃O₄BrF (M+) m/z: 302,9290, hallado: 302,9290.

45 Ejemplo 40

Preparación de 5-bromo-6(8)-nitro-7-trifluorometil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

50 Se adaptó el procedimiento de Cheeseman, citado anteriormente. Se disolvió 5-bromo-7-trifluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (75 mg, 0,24 mmol) en H₂SO₄ concentrado (1 ml) a 0°C con agitación, a lo que se añadió KNO₃ (30 mg, 0,28 mmol, Baker) a 0°C con agitación. Se agitó la mezcla a 0°C durante 2 h. luego a temperatura ambiente durante 1 día. Se cambió el color de la mezcla a amarillo marrón. Luego se vertió en agua con hielo (10 g) para separar el precipitado amarillo claro. Se recogió el precipitado mediante filtración y se lavó con agua destilada (1 ml) seguido por etanol (2 x 1 ml) dando 5-bromo-6(8)-nitro-7-trifluorometil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (78 mg, 92%) que contenía algo de isómero mediante RMN. La cristalización en DMSO/H₂O dio el producto puro como un microcristal blanco. P.f.: 290-2°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3435; 3143; 1713; 1613; 1555. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ. 7,519 (s, 1H) para 6-nitro; 7,960 (s, 1H) para 8-nitro (6:8=70:30); 11,811 (s, 1H); 12,391 (s, 1H). HRMS: calc. para C₉H₃N₃O₄F₃Br (M⁺) m/z: 352,9258; hallado: 352,9270.

60 Ejemplo 41

Preparación de 1(4)-amino-5,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

65 Se adaptó el procedimiento de Shin, S.C. y Lee. Y.Y., Taehan Hwahakhoe Chi 27(5):382-4 (1983). Se disolvió 5,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (46 mg, 0,144 mmol) en KOH 3 N (2 ml) a 60°C durante 1 h y se añadió gota a gota NH₂OSO₃H (20 mg, 0,172 mmol, Aldrich) en agua destilada (0,5 ml) en la disolución anterior con agitación a

ES 2 313 714 T3

60°C. Apareció algo de precipitado tras 15 min., luego se añadió una segunda porción de $\text{NH}_2\text{OSO}_3\text{H}$ de 20 mg. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Se recogió el precipitado blanco mediante filtración, se lavó con agua destilada fría (0,5 ml), produciendo 1-amino-5,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (38 mg, 79%) tras secar al aire a 60°C durante 2 h (contiene la 4-amino-5,7-dibromo-2,3-quinoxalindiona isomérica, mediante RMN, pero no se sabe cual se produce en una mayor cantidad). Se disolvió una muestra de 38 mg de 1-amino-5,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta en agua destilada (4 ml) a 60°C, se eliminó el material insoluble mediante filtración y se acidificó el filtrado con AcOH hasta pH = 5 dando un precipitado blanco, que se recogió mediante filtración y se lavó con agua destilada fría (2 x 1 ml). Se secó el precipitado a 60°C durante 2 h produciendo 1-amino-5,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (28 mg, 58,5%) como un polvo blanco con algo de isómero. P.f.: 273-5°C (desc. a partir de 270°C). IR (KBr, cm^{-1}): 3435; 3289; 3190; 1719; 1672; 1625; 1584. RMN (^1H , DMSO- d_6): δ 5,831 ((s, 2H); 7,672 (d, J=15 Hz, 1H); 7,810 (d, J=15 Hz, 1H); 11,275 (s, 1H). HRMS: calc. para $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2\text{Br}_2$ (M^+) m/z: 332,8746; Hallado: 332,8744.

15 Ejemplo 42

Preparación de 1(4)-amino-5,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se adaptó el procedimiento de Wallace, R.G., Org. Prep. Proc. Int. 14:269 (1982). Se disolvió 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (52 mg, 0,225 mmol) en KOH 3 N (1 ml) a 60°C durante 0,5 h, y se añadió gota a gota $\text{NH}_2\text{OSO}_3\text{H}$ (30 mg, 0,265 mmol, Aldrich) en agua destilada (0,5 ml) en la disolución anterior con agitación a 60°C. Apareció algo de precipitado tras 15 min. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se recogió el precipitado blanco mediante filtración, se lavó con agua destilada fría (0,5 ml) y se secó en rotavapor a 60°C durante 2 h produciendo a 1-amino-5,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (38 mg, 69%), que incluía un poco del isómero (4-amino-5,7-dicloro-2,3-quinoxalindiona) mediante ^1H RMN (se sabe que el isómero está presente en una mayor cantidad).

Se disolvió una muestra de 38 mg de 1(4)-amino-5,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta en agua destilada (4 ml) a 60°C, se eliminó el material insoluble mediante filtración, se acidificó el filtrado con AcOH hasta pH = 5 dando un precipitado blanco, que se recogió mediante filtración y se lavó con agua destilada fría (2 x 1 ml). Se secó el precipitado en rotavapor a 60°C durante 2 h, produciendo 1(4)-amino-5,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (29 mg, 53,5%) como un polvo blanco, p.f.: 294-6°C (con desc.) IR (KBr, cm^{-1}): 3450; 3325; 3200; 3075; 1693; 1625; 1593; 1500; 1368. RMN (^1N , DMSO- d_6): δ 5,838 (s, 2H); 7,454 (d, J=2,1 Hz, 1H); 7,639 (d, J=2,1 Hz, 1H); 11,691 ((s, 1H). HRMS: calc. para $\text{C}_8\text{H}_5\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$ (M^+) m/z: 244,9757; hallado: 244,9769.

35 Ejemplo 43

Preparación de 1-amino-5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se adaptó el procedimiento de Shin, S.C. y Lee, Y.Y., Taehan Hwahakhoe Chi 27(5):382-4 (1983). Se disolvió 5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (85 mg, 0,33 mmol) en KOH 3 N (1,5 ml) a 60°C durante 0,5 h dando una disolución marrón claro, y se añadió gota a gota $\text{NH}_2\text{OSO}_3\text{H}$ (45 mg, 0,396 mmol, Aldrich) en agua destilada (0,5 ml) en la disolución anterior con agitación a 60°C. Apareció algo de precipitado tras 15 min. Luego se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se recogió el precipitado marrón mediante filtración, se lavó con agua destilada fría (0,5 ml) y se secó en rotavapor a 60°C durante 2 h, produciendo 1-amino-5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (59 mg, 65,5%, 5% de isómero de 4-amino-5-bromo-7-fluoro-2,3-quinoxalindiona mediante RMN).

Se disolvió una muestra de 59 mg de 1-amino-5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta en agua destilada (5 ml) a 60°C, se eliminó el material insoluble mediante filtración y se acidificó el filtrado con AcOH hasta pH = 5 dando un precipitado marrón, que se recogió mediante filtración y se lavó con agua destilada fría (2 x 1 ml). Se secó el precipitado en rotavapor a 60°C durante 2 h, produciendo 1-amino-5-bromo-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona pura (49 mg, 54,5%) como un polvo marrón; p.f.: 293-5°C (con desc.) IR (KBr, cm^{-1}): 3443; 3318; 3206; 3081; 1731; 1668; 1612; 1600; 1506; 1343. RMN (^1H , DMSO- d_6): δ 5,832 (s, 2H); 7,439-7,519 (m, 2H); 11,207 (s, 1H). HRMS: calc. para $\text{C}_8\text{H}_5\text{BrFN}_3\text{O}_2$ (M^+) m/z: 272,9548; hallado: 272,9569.

60 Ejemplo 44

Preparación de 5,6-dicloro-2-mercaptobencimidazol (compuesto de referencia)

Se adaptó el procedimiento de Van Allan, J.A.V. y Deacon, B.D., Organic Síntesis. IV:569. Se calentó una mezcla de 1,2-diamino-4,5-diclorobenceno (510 mg, 2,88 mmol, Aldrich), hidróxido de potasio (190 mg, 3,40 mmol), disulfuro de carbono (260 mg, 3,40 mmol), etanol al 95% (3 ml) y agua (0,45 ml) a reflujo durante 3 h. Luego se añadió carbón activado (120 mg) con cuidado, y tras haberse calentado la mezcla a la temperatura de reflujo durante 10 min. se eliminó el carbón activado mediante filtración. Se calentó el filtrado hasta 60-70°C, se añadió agua templada (3 ml) y luego se añadió ácido acético (0,25 ml) en agua (0,5 ml) con buena agitación durante la noche. Se colocó la mezcla

ES 2 313 714 T3

en una nevera durante 3 h obteniendo dos cristales (marrones y blancos). Los cristales marrones se retiraron lavando con cloroformo (5 ml). La recrystalización en EtOH caliente/H₂O dio 5,6-dicloro-2-mercaptobencimidazol puro (545 mg, 86%) como agujas largas blancas. Se midió el p.f.: el color de 5,6-dicloro-2-mercaptobencimidazol cambió a amarillo a 303°C; la descomposición de 5,6-dicloro-2-mercaptobencimidazol es obvia a 305°C y se fundió dando un líquido negro a 308-10°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3447; 3107; 3043; 1607; 1496; 1461. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,305 (s, 2H); 12,781 (s, 2H). HRMS: calc. para C₇H₄Cl₂N₂S (M⁺) m/z: 217,9425, Hallado: 217,9482.

En los siguientes ejemplos 45-55, los puntos de fusión se determinan en tubos capilares abiertos en aparatos Thomas Hoover y Mel-Temp y no están corregidos. Los espectros de IR y ¹H RMN de todos los compuestos concordaban con la estructura asignada y coincidían con los datos notificados previamente siempre que estuvieran disponibles. Se registraron los espectros de ¹H RMN en un instrumento QE-300 de General Electric a 300 MHz; se notifican los desplazamientos químicos en unidades delta en referencia a la señal de protón residual del disolvente deuterado (CH₃SOCH₂D, δ 2,49). Se registraron los espectros de infrarrojo en un espectrómetro Nicolet 5DXB FT-IR. Se registraron las absorciones en números de onda (cm⁻¹). Se registraron los espectros de masas en un espectrómetro de masas VG ZAB-2-HF con un sistema de datos VG-11-250, en el modo de ionización electrónica (70 eV) a menos que se indique lo contrario. Todos los disolventes eran de calidad de reactivo. Los reactivos se usaron tal como se recibieron a menos que se indique lo contrario.

20 Ejemplo 45

Preparación de 1-carboximetil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

1-Carboximetil-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-3-ona. Se adaptó el procedimiento de Borthakur, N. *et al.*, Ind. J. Chem. 20B:822 (1981). Se neutralizó la disolución agitada de ácido cloroacético (19,000 g, 0,200 mol) en agua (100 ml) con carbonato de sodio (10,600 g, 0,100 mol) y se le añadió *o*-fenilendiamina (10,800 g, 0,100 mol, Aldrich). Se sometió a reflujo la disolución transparente durante 4 h, se enfrió y se hizo alcalina (pH ~ 10) con disolución acuosa de carbonato de sodio 0,3 M (150 ml). Se eliminó una pequeña cantidad de sólido residual mediante filtración. Se acidificó el filtrado claro (pH ~ 2) con HCl concentrado. Precipitó el sólido de color gris. Se filtró y se secó a vacío (aspirador de agua) obteniendo 17,2 g (83%, puro mediante ¹H RMN) de producto como un polvo gris claro, p.f. 227-230°C (véase la bibliografía p.f. 228-230°C, Cheeseman, citado anteriormente). Era suficientemente puro para su uso en la siguiente reacción.

1-Carboximetil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se adaptó el procedimiento de Borthakur, N. *et al.*, Ind. J. Chem. 20B: 822 (1981). A una disolución con agitación de 1-carboximetil-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-3-ona (15,400 g, 0,075 mol) e hidróxido de sodio (5,20 g, 0,13 mol) en agua (250 ml), se le añadió gradualmente una disolución de KMnO₄ (20,800 g 0,132 mol) en NaOH ac. (4% p/v, 120 ml) y se sometió a reflujo la disolución de color púrpura oscuro durante 4 h, se enfrió y se filtró. Se acidificó el filtrado claro (pH ~ 2) con HCl concentrado. La filtración a vacío (aspirador de agua) produjo 9,200 g (56%, puro mediante ¹H RMN) de 1-carboximetil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona como un polvo de color crema, p.f. > 300°C (descompone) (véase la bibliografía, p.f. > 300°C, Borthakur *et al.*, citado anteriormente). Era suficientemente puro para su uso en la siguiente reacción; ¹H RMN: δ 4,84 (s, 2H), 7,13-7,27 (m, 4H), 12,16 (s, 1H); IR (KBr, cm⁻¹): 3431, 1743, 1687, 1481, 1406, 1393, 1250.

45 Ejemplo 46

Preparación de 1-carboximetil-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

Se adaptó el procedimiento de Jorgensen *et al.*, citado anteriormente. Se suspendieron 1-carboximetil-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (1,500 g, 0,068 mol) y Ag₂SO₄ (2,232 g, 0,071 mol) en H₂SO₄ concentrado (7,5 ml). Se le añadió bromo (0,75 ml, 0,014 mol, Aldrich) a 28°C y se agitó la suspensión a 28°C durante 24 h. Entonces se añadió tetracloruro de carbono (7,5 ml) a la suspensión y se calentó a 50°C durante 2 h. Entonces se vertió en hielo-agua (75 g). Se filtró el sólido blanco precipitado y se lavó con agua (10 ml) y se secó a vacío (aspirador de agua). Luego se trató con NaOH ac. 4 M (60 ml). Se eliminó por filtración el residuo y se acidificó el filtrado transparente (pH ~ 3) con HCl concentrado. Se filtró el sólido blanco precipitado y se secó produciendo 1,81 g (70%, puro mediante ¹H RMN) de 1-carboximetil-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona ácida como un polvo blanco, p.f. > 300°C (descompone) (véase la bibliografía, p.f. > 300°C, Jorgensen *et al.*, citado anteriormente); ¹H RMN: δ 4,85 (s, 2H), 7,44 (s, 1H), 7,73 (s, 1H), 12,28 (s, 1H); IR (KBr, cm⁻¹): 3437, 1687, 1481, 1406, 1393, 1250.

60 Ejemplo 47

Preparación de 1-carboximetil-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

6,7-Dicloroquinoxalin-2(1H)-ona. Se adaptó el procedimiento de Kazimierzuk, Z. *et al.*, Liebigs Ann. Chem 75 (1982). Se sometió a reflujo una disolución de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (500 mg, 2,82 mmol, Pfaltz y Bauer), ácido glioxálico monohidratado (389 mg, 4,23 mmol, Aldrich) en etanol (8 ml) durante 12 h. Con enfriamiento hasta 28°C, precipitó un sólido de color púrpura que se filtró a vacío (aspirador de agua), se lavó con etanol frío (20 ml) y se

ES 2 313 714 T3

secó adicionalmente a vacío obteniendo 575 mg (94%, puro mediante $^1\text{H RMN}$) de 6,7-dicloroquinoxalin-2(1H)-ona como un polvo de color púrpura claro, p.f. 325-328°C (véase la bibliografía, p.f. >300°C; Kazimierczuk, *et al.*, citado anteriormente). Era suficientemente puro para su uso en la siguiente reacción. $^1\text{H RMN}$: δ 7,40 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 12,52 (s, 1H). IR (KBr, cm^{-1}): 1668, 1606, 1468, 1387.

5

6,7-Dicloro-1-etoxicarbonilmetilquinoxalin-2(1H)-ona. Se adaptó el procedimiento de Jorgensen *et al.*, citado anteriormente. Bajo una atmósfera de nitrógeno, se disolvió sodio (60 mg, 2,60 mmol) en etanol absoluto (20 ml) y se le añadió 6,7-dicloroquinoxalin-2(1H)-ona (520 mg, 2,420 mmol). Se sometió a reflujo la disolución de color púrpura oscuro durante 30 min., se enfrió hasta 28°C y se le añadió bromoacetato de etilo (485 mg, 2,900 mmol, Aldrich) y se sometió a reflujo durante 2 h más. Durante este tiempo, se separó un sólido de color púrpura que se filtró, se lavó con etanol absoluto (10 ml) y se secó al aire durante la noche produciendo 636 mg (91%, puro mediante $^1\text{H RMN}$) 6,7-dicloro-1-etoxicarbonilmetilquinoxalin-2(1H)-ona como un polvo de color púrpura claro, p.f. 207-210°C (véase la bibliografía, p.f. no notificado). Era suficientemente puro para su uso en la siguiente reacción. $^1\text{H RMN}$: δ 1,18 (t, 3H, J = 6,9 Hz), 4,14 (q, 2H, J = 6,9 Hz), 5,04 (s, 2H), 8,01 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,33 (s, 1H). IR (KBr, cm^{-1}): 1737, 1662, 1400, 1231.

15

1-Carboximetil-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se adaptó el procedimiento de Jorgensen *et al.*, citado anteriormente. Se suspendió 6,7-dicloro-1-etoxicarbonilmetilquinoxalin-2(1H)-ona (528 mg, 1,840 mmol) en disolución ac. de NaOH 0,63 M (25 ml) y se le añadió H_2O_2 al 30% (0,700 ml). Se agitó la suspensión a 70-80°C durante 5 h, tiempo durante el que se formó una disolución de color rojo oscuro. Luego se enfrió en un baño de hielo y se acidificó (pH \sim 2) con HCl concentrado. Se filtró el sólido precipitado produciendo 484 mg de polvo de color púrpura claro. La cristalización en DMF-agua proporcionó 457 mg (85%, puro mediante $^1\text{H RMN}$) de 1-carboximetil-6,7-dicloroquinoxalin-2,3(1H,4H)-diona ácida como un polvo de color gris; p.f. 317-320°C (véase la bibliografía, p.f. 317-319°C, Jorgesen *et al.*, citado anteriormente); $^1\text{H RMN}$: δ 4,85 (s, 2H), 7,31 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 12,28 (s, 1H); IR (KBr, cm^{-1}): 3428, 3129, 1694, 1489, 1396.

25

Ejemplo 48

30 *Preparación de 6,7-dicloro-8-nitroquinoxalin-2(1H)-ona (compuesto de referencia)*

A una suspensión agitada de 6,7-dicloroquinoxalin-2(1H)-ona (100 mg, 0,465 mmol) en H_2SO_4 concentrado (1,5 ml), se le añadió agua (1,0 ml) para formar una disolución. Entonces se enfrió hasta 5-10°C y se añadió KNO_3 (50 mg, 0,46 mmol) en una porción. La adición de KNO_3 da como resultado una disolución de color verde oscuro que se agitó a 5-10°C durante 3 h y luego a 28°C durante 60 h. Se vertió la suspensión amarilla así obtenida en hielo-agua (15 g) y se filtró el sólido amarillo resultante y se secó al aire durante la noche obteniendo 78 mg de producto bruto como un polvo amarillo. La cristalización en DMF-agua proporcionó 45 mg (37%, pura mediante $^1\text{H RMN}$) de 6,7-dicloro-8-nitroquinoxalin-2(1H)-ona como un polvo amarillo; p.f. 330-332°C (descompone); $^1\text{H RMN}$: δ 7,59 (s, 1H), 8,28 (s, 1H); IR (KBr, cm^{-1}): 1695, 1654, 1555, 1367; HRMS calc. para $\text{C}_8\text{H}_2\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$ (M^+) m/z 258,9551, hallado m/z 258,9550.

40

Ejemplo 49

45 *Preparación de 1-carboximetil-6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)*

A una disolución agitada de 1-carboximetil-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (100 mg, 0,264 mmol) en H_2SO_4 concentrado (1,5 ml) a 5-10°C, se le añadió KNO_3 (28 mg, 0,28 mmol) en una porción. Se agitó la disolución verde oscura resultante a 5-10°C durante 30 min. y a 28°C durante la noche. Se vertió la suspensión de color amarillo así obtenida en hielo-agua (15 g) y se filtró el sólido amarillo brillante resultante y se secó a vacío obteniendo 53 mg (47%, puro mediante $^1\text{H RMN}$) de 1-carboximetil-6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona como un polvo amarillo brillante; p.f. 260-264°C. $^1\text{H RMN}$: δ 4,91 (s, 1H), 7,98 (s, 1H). IR (KBr, cm^{-1}): 1701, 1543, 1391, 1244. HRMS calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_6$ (M^+) m/z 420,8546, hallado m/z 420,8559.

55

Ejemplo 50

Preparación de 6,7-dicloro-N-hidroxi-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

60 Se llevaron a cabo todas las reacciones bajo una atmósfera de nitrógeno. Los reactivos se usaron tal como se recibieron a menos que se indique lo contrario. Los puntos de fusión se tomaron en un aparato de punto de fusión Mel-Temp y están sin corregir. Se colocaron las muestras en el bloque cuando la temperatura era de > 250°C con el fin de minimizar la descomposición antes de la fusión. Se destiló tetrahidrofurano (THF) a partir de disolución de cetilo de benzofenona de sodio azul. Se secó la DMF sobre tamices moleculares. Se registraron los espectros de $^1\text{H RMN}$ en un instrumento QE-300 de General Electric a 300 MHz; se notifican los desplazamientos químicos en unidades delta en referencia a señales de protones residuales de los disolventes deuterados (CDCl_3 , δ 7,26; $\text{CH}_3\text{SOCH}_2\text{D}$, δ 2,49). Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrómetro Nicolet 5DXB FT-IR.

65

ES 2 313 714 T3

Oxamato de etil-N-(4,5-dicloro-2-nitro-fenilo). Se preparó oxamato de etil-N-(4,5-dicloro-2-nitro-fenilo) usando una adaptación del método de Loev, *et al.*, J. Med. Chem. 28:363 (1985). A una disolución agitada de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (2,07 g, 0,01 mol) en THF anhidro (15 ml) y trietilamina (1,5 ml, 0,011 mol) a 0°C se le añadió gota a gota cloruro de etiloxalilo (4,6 g, 0,015 mol). Se permitió que se calentase la suspensión amarilla resultante hasta 25°C en el baño y luego se agitó durante 3 h. Se vertió la suspensión marrón resultante en 75 ml de agua con hielo. Se formó un precipitado marrón. La mezcla se filtró a vacío y se secó el sólido al aire durante 1 h produciendo 3,27 g de un sólido marrón oscuro que se disolvió en etanol (38 ml) con calentamiento hasta 70°C. Se añadió agua (6 ml) hasta que apareció precipitación. Se calentó la mezcla de nuevo hasta que se redisolvió el precipitado. Se dejó enfriar la disolución marrón lentamente, dando cristales similares a agujas amarillos. Se filtró la mezcla a vacío y se secaron al aire los cristales durante 2 h produciendo 1,7322 g (5,64 mmol) de oxamato de etil-N-(4,5-dicloro-2-nitro-fenilo) como agujas amarillo pálido (56,4%): p.f. 95-97°C. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 11,897 (sa, 1H, NH), 9,067 (s, 1H, H-3), 8,412 (s, 1H, H-6), 4,463 (q, 2H CH₂), 1,435 (t, 3H, CH₃).

6,7-Dicloro-N-hidroxi-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se preparó este compuesto usando una adaptación del método de Loev, *et al.*, citado anteriormente. Se hidrogenó una mezcla de oxamato de etil-N-(4,5-dicloro-2-nitro-fenilo) (0,307 g, 1 mmol) y 0,04 g de Pd al 5%-C en 5 ml de DMF a 45 psi durante 1,5 h. Se filtró la mezcla de reacción y se añadió el líquido a agua (18 ml). Se formó una precipitación blanca. Se filtró la mezcla a vacío. Se enjuagó el sólido con agua (5x2 ml) y se secó al aire durante 1 h produciendo 215,14 mg (0,87 mmol) de 6,7-dicloro-N-hidroxi-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona como un sólido amarillo pálido (87%). Se disolvió el sólido amarillo pálido (215 mg, 0,87 mmol) en 4 ml de DMSO con calentamiento. Se añadió agua (0,8 ml) hasta que apareció precipitación. Se calentó la mezcla de nuevo para redissolver el precipitado. Se enfrió la disolución amarilla. Aparecieron cristales amarillo pálido que se recogieron mediante filtración a vacío y se aclararon con agua (5x2 ml) y se secaron a vacío produciendo 173 mg (0,70 mmol) de 6,7-dicloro-N-hidroxi-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona como cristales amarillo pálido. p.f. > 300°C (desc.). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,244 (sa, 1H, NH), 11,953 (sa, 1H, N-OH), 7,562 (s, 1H, H-8), 7,318 (s, 1H, H-5). HRMS calc. para C₈H₄Cl₂N₂O₃, 245,9599; hallado, 245,9600.

Ejemplo 51

30 *Preparación de N-(N'-fenilcarboxamidil)metil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)*

A una disolución con agitación de 1-carboximetil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (100 mg, 0,450 mmol) y anilina (62 mg, 0,66 mmol) en DMF seca (2 ml) bajo N₂ a 28°C, se le añadió DCC (95 mg, 0,46 mmol, Aldrich) en una porción. Se agitó la disolución durante 4 h a 28°C. Se filtró el sólido insoluble y se lavó con DMF (1 ml). Se vertió el filtrado transparente en agua (30 ml). Se filtró el sólido así obtenido y se secó a vacío (aspirador de agua) produciendo 133 mg de producto bruto como un polvo gris. Se purificó mediante extracción Soxhlet en etanol en ebullición (20 ml), manteniendo la temperatura del baño de aceite a 120°C, durante 4 h. Se secó el material insoluble (en el manguito) a vacío obteniendo 55 mg de N-(N'-fenilcarbox-amidil)metil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona pura (¹H RMN) como un sólido blanco (también acabó extrayéndose parte del producto mediante etanol caliente lo que explica el bajo rendimiento del producto puro). p.f. > 300°C (descompone). ¹H RMN: δ 4,92 (s, 2H), 7,01-7,30 (m, 7H), 7,51 (d, 2H, J = 6,9 Hz), 10,26 (s, 1H), 12,13 (s, 1H). IR (KBr, cm⁻¹): 3148, 1715, 1671, 1600, 1557. HRMS: calculado para C₁₆H₁₃N₃O₃, 295,0951; Observado, 296,1033.

45 Ejemplo 52

Preparación de N-(N'-(p-nitrofenil)carboxamidil)metil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

A una disolución con agitación de N-carboximetil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (250 mg, 1,140 mmol) y p-nitroanilina (156 mg, 1,140 mmol) en DMF (3 ml) bajo N₂ a 0°C, se le añadió DCC (233 mg, 1,140 mmol) en una porción. Se dejó calentar la disolución hasta 28°C y se agitó a esa temperatura durante la noche. Se filtró el sólido precipitado y se vertió el filtrado transparente en agua (30 ml). Se filtró el sólido así obtenido y se secó a vacío (aspirador de agua) obteniendo 100 mg de producto bruto como un polvo amarillo. Se purificó el producto bruto mediante extracción Soxhlet en etanol en ebullición (20 ml), manteniendo la temperatura del baño de aceite a 120°C, durante 4 h. Se secó el material insoluble (en el manguito) a vacío obteniendo 23 mg de N-(N'-(p-nitrofenil)carboxamidil)metil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona pura (¹H RMN) como un polvo amarillo claro (también acabó extrayéndose parte del producto mediante etanol caliente lo que explica el bajo rendimiento del producto puro). p.f. > 300°C (descompone). ¹H RMN: δ 5,02 (s, 1H), 7,13-7,3 (m, 4H), 7,78 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 8,21 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 10,92 (s, 1H), 12,16 (s, 1H). IR (KBr, cm⁻¹): 3453, 1701, 1684, 1625, 1572, 1509. HRMS: calculado para C₁₆H₁₂N₄O₅, 340,0808; Observado, 340,0811.

Ejemplo 53

65 *Preparación de N-(N'-(p-aminofenil)carboxamidil)metil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)*

A una disolución con agitación de N-carboximetil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona ácida (200 mg, 0,910 mmol) y p-fenilendiamina (98 mg, 0,91 mmol) en DMF (2 ml) bajo N₂ a 0°C, se le añadió DCC (190 mg, 0,910 mmol)

ES 2 313 714 T3

en una porción. Se dejó calentar la disolución hasta 28°C y se agitó a esa temperatura durante la noche. Se filtró el sólido precipitado y se vertió el filtrado transparente en agua (10 ml). Se filtró el sólido así obtenido y se secó a vacío (aspirador de agua) obteniendo 180 mg de producto bruto como un polvo marrón. Se purificó el producto mediante extracción Soxhlet en etanol en ebullición (20 ml), manteniendo la temperatura del baño de aceite a 120°C, durante 4 h. Se secó el material insoluble (en el manguito) a vacío obteniendo 135 mg de N-(N'-(p-aminofenil)carboxamidil)metil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona pura (¹H RMN) como un polvo blanco. p.f. >300°C (descompone). ¹H RMN: δ 4,84 (s, 2H), 4,93 (s, 2H), 6,5 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,15-7,25 (m, 6H), 9,83 (s, 1H), 12,15 (s, 1H). IR (KBr, cm⁻¹): 3462, 3143, 1793, 1693, 1593, 1443. HRMS: calculado para C₁₆H₁₄N₄O₃, 310,1066; Observado, 310,1071.

10

Ejemplo 54

Preparación de N-(N'-fenilcarboxamidil)metil-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

15

A una disolución con agitación de N-carboximetil-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (100 mg, 0,250 mmol) y anilina (25 mg, 0,25 mmol) en DMF anhidra (1,5 ml) bajo N₂ a 28°C, se le añadió DCC (55 mg, 0,25 mmol) en una porción. Se agitó la disolución a 28°C durante 18 h. Se filtró el sólido blanco insoluble y se vertió el filtrado claro en agua (6 ml). Se filtró el sólido precipitado y se secó al aire obteniendo 113 mg de producto bruto como un polvo gris. Luego se purificó el producto bruto mediante extracción Soxhlet en etanol en ebullición (20 ml), manteniendo la temperatura del baño de aceite a 120°C, durante 5 h. Se secó el residuo (en el manguito) en el horno (aproximadamente 70-80°C) durante la noche proporcionando 35 mg de N-(N'-fenilcarboxamidil)metil-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona pura (¹H RMN) como un polvo gris claro; p.f. > 300°C (descompone). ¹H RMN: δ 4,97 (s, 1H), 6,99-7,11 (m, 1H), 7,23-7,37 (m, 2H), 7,44 (s, 1H), 7,52 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,73 (s, 1H), 10,25 (s, 1H), 12,25 (s, 1H). IR (KBr, cm⁻¹): 3620, 3468, 1714, 1694, 1595, 1542. HRMS: calculado para C₁₆H₁₁Br₂N₃O₃, 450,9168; Observado, 450,9177.

20

25

Ejemplo 55

30

Preparación de N-(N'-(m-nitrofenil)carboxamidil)metil-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

A una disolución con agitación de N-carboximetil-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (100 mg, 0,260 mmol) y m-nitroanilina (40 mg, 0,29 mmol) en DMF anhidra (2 ml) bajo N₂ a 28°C, se le añadió DCC (60 mg, 0,29 mmol) en una porción. Se agitó la disolución durante 4 h a 28°C. Se filtró el sólido insoluble y se lavó con DMF (1 ml). Entonces se vertió el filtrado claro en agua (30 ml). Se filtró el sólido precipitado y se secó a vacío (aspirador de agua) obteniendo 65 mg de producto bruto como un polvo amarillo. Se purificó el producto mediante extracción Soxhlet en etanol en ebullición (20 ml), manteniendo la temperatura del baño de aceite a 120°C, durante 4 h. Se secó el material insoluble (en el manguito) a vacío obteniendo 30 mg de N-(N'-(m-nitrofenil)carboxamidil)metil-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona pura (¹H RMN) como un sólido blanco (también acabó extrayéndose parte del producto mediante etanol caliente que explica el bajo rendimiento del producto puro). p.f. > 300°C (descompone). ¹H RMN: δ 4,98 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,61 (d de d visto como un t, J = 8,1 Hz) 7,79 (s, 1H), 7,86 (d, 1H, J = 9 Hz), 7,91 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 8,54 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 12,28 (s, 1H). IR (KBr, cm⁻¹): 3444, 3289, 1707, 1686, 1672, 1602. HRMS: calculado para C₁₆H₁₀Br₂N₄O₅, 495,9018; Observado, 495,9008.

40

45

General

En las siguientes síntesis, los reactivos se usaron tal como se recibieron a menos que se indique lo contrario. Los puntos de fusión se tomaron en un aparato de punto de fusión Mel-Temp y están sin corregir. Se colocaron las muestras en el bloque cuando la temperatura era de >250°C con el fin de minimizar la descomposición antes de la fusión. Se realizó cromatografía en columna en el modo ultrarrápido sobre gel de sílice Davisil (200-425 de malla), a menos que se indique lo contrario. Se realizó cromatografía de capa fina analítica en placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ con base de aluminio y se efectuó la visualización con una lámpara ultravioleta. Se registraron los espectros de ¹H RMN en un QE-300 de General Electric de 300 MHz; los desplazamientos químicos se notifican en unidades de delta que hacen referencia a señales de protón residuales de los disolventes deuterados (CHCH₃, d 7,26; CHD₂OD, d 3,30; CD₃SOCD₂H, d 2,49; CD₃COCD₂H, d 2,04). Se llevaron a cabo los espectros de ¹³C RMN a 75 MHz. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrómetro FT-IR de Nicolet 5DXB. Las absorciones se registraron en números de onda (cm⁻¹) y la intensidad de las absorciones se indica mediante las letras *s* (fuerte), *m* (media), y *w* (débil). Se registraron los espectros de masas en un espectrómetro de masas VG ZAB-2-HF con un sistema de datos VG-11-250, en el modo de ionización electrónica (70 eV) a menos que se indique lo contrario. Se realizaron microanálisis por Desert Analytics de Tuscon, Arizona.

65

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 56

Preparación de 5-amino-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

5 A una mezcla agitada de 5-nitro-6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (327 mg, 0,89 mmol) en etanol (10 ml) se le añadió SnCl₂·2H₂O (1,0 g, 4,45 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación durante 4 h. Luego se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se recogió el precipitado amarillo mediante filtración, seguido por lavado con etanol frío (2x1 ml), obteniendo 227 mg (76%) del producto del título bruto (contiene impurezas secundarias mediante RMN). La cristalización en DMSO/H₂O dio 193 mg del producto del título puro como agujas amarillo brillante; p.f.: 324-6°C (desc.), el color cambió a partir de 270°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3456; 3281; 1700; 1643. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 5,844 (s, 2H); 6,732 (s, 1H); 11,257 (s, 1H); 11,810 (s, 1H). Pureza: >96,96% mediante HPLC. HRMS: calc. para C₈H₅N₃O₂Br₂ (M⁺) m/z 332,8747; hallado: 332,8754. Potencia con respecto a DCK: 341%.

15 Ejemplo 57

Preparación de 5-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

20 A una mezcla agitada de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (110 mg, 0,40 mmol) en etanol (6 ml) se le añadió SnCl₂·2H₂O (448 mg, 2,0 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación durante 1 h para formar una disolución transparente y se sometió a reflujo de manera continua durante otras 3 h. Luego se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se recogió el precipitado amarillo mediante filtración y se lavó con etanol frío (2x1 ml) dando 61 mg (62%) del compuesto del título bruto (contiene impurezas secundarias mediante RMN). La cristalización en DMSO/H₂O dio 43 mg del compuesto del título puro como agujas amarillo brillante, p.f. > 350°C (desc.), el color cambió a partir de 320°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3468; 3389; 3057; 1695; 1636; 1596; 1397. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 5,935 (s, 2H); 6,595 (s, 1H); 11,317 (s, 1H); 11,868 (s, 1H). Pureza >98,95% mediante HPLC. HRMS: calc. para C₈H₅N₃O₂Br₂ (M⁺) m/z: 244,9757; hallado 244,9740. Potencia con respecto a DCK: 323%.

30

Ejemplo 58

Preparación de 5-amido-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

35 A una disolución agitada de 5-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (61,5 mg, 0,25 mmol) en DMF anhidra (7 ml) se le añadió trietilamina (33 mg, 32 mmol, destilada antes de su uso) y cloruro de acetilo (20 mg, 0,255 mmol, destilado antes de su uso). La mezcla se volvió una disolución amarilla tras 2 min. Tras 2 h a 25°C, apareció un precipitado y se continuó la agitación durante la noche, tiempo durante el que apareció más precipitado blanco. Se recogió el precipitado mediante filtración y se lavó con agua (2x1 ml), produciendo un polvo blanco que eran 34 mg del compuesto del título bruto (contiene algo de impureza mediante RMN). El filtrado se añadió a agua (15 ml) obteniendo un precipitado y éste se recogió mediante filtración y se lavó con agua (2x1 ml), produciendo 29 mg de producto puro (mediante RMN). El rendimiento total fue del 88%. La cristalización en DMSO/H₂O dio 25 mg del compuesto del título puro como microcristales blancos; p.f.: 320-2°C (desc. a partir de 315°C). IR (KBr, cm⁻¹): 3500, 3162, 3056, 1706, 1606, 1531. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 2,065 (s, 3H); 7,236 (s, 1H); 9,621 (s, 1H); 11,655 (s, 1H); 12,096 (s, 1H). HRMS: calc. para C₁₀H₇N₃O₃Cl₂ (M⁺) m/z: 286,9863; hallado: 286,9859. Potencia con respecto a DCK: 44%.

50 Ejemplo 59

Preparación de 6-amino-5,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

55 A una mezcla agitada de 6-nitro-5,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (81 mg, 0,295 mmol) en etanol (3 ml) se le añadió SnCl₂·2H₂O (331 mg, 1,47 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación hasta 0,5 h, para formar una disolución transparente y se sometió a reflujo de manera continua durante otras 0,5 h. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se recogió el precipitado amarillo mediante filtración, seguido por lavado con etanol frío (2x1 ml) dando 70 mg (97%) del compuesto del título bruto (contiene impurezas secundarias mediante RMN). La cristalización en DMSO/H₂O dio 32 mg del compuesto del título puro como agujas amarillo brillante; p.f.: 342-5°C (desc. a partir de 335°C), el color cambió a partir de 325°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3468, 3362, 3193, 1693, 1631, 1493, 1375; RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 5,418 (s, 2H); 6,999 (s, 1H); 11,238 (s, 1H); 11,776 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₅N₃O₂Cl₂ (M⁺) m/z: 244,9757; hallado 244,9769. Potencia con respecto a DCK: 8,6%.

65

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 60

Preparación de 6-amino-7-cloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

5 A una mezcla agitada de 6-nitro-7-cloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (35 mg, 0,145 mmol) en etanol (2 ml) se le añadió SnCl₂·2H₂O (163 mg, 0,724 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación durante 0,5 h para formar una disolución transparente y se sometió a reflujo de manera continua durante otras 0,5 h. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se recogió el precipitado amarillo mediante filtración, seguido por lavado con etanol frío (1x1 ml) dando 25 mg (82%) del compuesto del título bruto (contiene impurezas secundarias mediante RMN). La cristalización en DMSO/H₂O dio 14 mg del compuesto del título puro como agujas amarillo brillante, p.f.: >350°C (desc. a partir de 335°C). IR (KBr, cm⁻¹): 3406, 3356, 3212, 1668, 1637, 1518, 1437. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 5,306 (s, 2H); 6,551 (s, 1H); 6,940 (s, 1H); 11,606 (s, 1H); 11,788 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₆N₃O₂Cl (M⁺) m/z: 211,0147; hallado 211,0159. Potencia con respecto a DCK: 28,0%.

15 Ejemplo 61

Preparación de 6-amino-7-bromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

20 A una mezcla agitada de 6-nitro-7-bromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (87 mg, 0,30 mmol) en etanol (3 ml) y DMSO (0,5 ml) se le añadió SnCl₂·2H₂O (343 mg, 1,50 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación durante 1 h para formar una disolución transparente que se sometió a reflujo durante otra 1 h. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se recogió el precipitado amarillo mediante filtración, seguido por lavado con etanol frío (2x1 ml) dando 50 mg (67%) del compuesto del título bruto (contiene impurezas secundarias mediante RMN). La cristalización en DMSO/H₂O dio 21 mg de compuesto del título puro como agujas amarillo brillante, p.f.: >300°C (desc. a partir de 315°C), el color cambió a partir de 300°C. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 5,257 (s, 2H); 6,558 (s, 1H); 7,087 (s, 1H); 11,599 (s, 1H); 11,792 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₆N₃O₂Br (M⁺) m/z: 254,9642; hallado 254,9630. Potencia con respecto a DCK: 7,1%.

30 Ejemplo 62

Preparación de 5-yodo-7-cloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

35 A. *Síntesis de 4-cloro-2-yodo-6-nitroanilina*: Se adoptó el procedimiento de Leeson, P.D. *et al.* (J. Med. Chem. 34: 1243-1252 (1991)). A una disolución de 4-cloro-2-nitroanilina (2,15 g, 12,45 mmol, Aldrich, usada tal como se recibió) en AcOH glacial (16 ml) se le añadió monoclóruo de yodo (2,114 g, 12,90 mmol, Aldrich). Se calentó la mezcla a 120°C durante 5 h, luego se enfrió y se vertió en agua con hielo (30 g). Se recogió el precipitado y se lavó con disolución de sulfito de sodio al 10% (20 ml), luego se cristalizó en MeOH dando 4-cloro-2-yodo-6-nitroanilina (1,05 g, 28%), como agujas marrones largas, p.f. 134-5°C. RMN (¹H, CDCl₃): δ 6,660 (s, 2H); 7,906 (d, 1H, J=2,1 Hz); 8,188 (d, 1H, J=1,8 Hz).

45 B. *Síntesis de 2-amino-4-cloro-6-yodoanilina*: A una mezcla agitada de 4-cloro-2-yodo-6-nitroanilina (389 mg, 1,305 mmol) en etanol (10 ml) se le añadió SnCl₂·2H₂O (1,468 g, 6,526 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación durante 0,5 h para formar una disolución transparente y luego se continuó el reflujo durante otras 0,5 h. Se enfrió la disolución hasta temperatura ambiente y se añadió agua con hielo (20 g). Se ajustó el pH a pH ~7 y se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se secó el extracto sobre MgSO₄, y se evaporó hasta sequedad dando 336 mg (96%) de 2-amino-4-cloro-6-yodoanilina, como un sólido marrón. RMN (¹H, CDCl₃): δ 3,536 (s, 2H); 3,763 (s, 2H); 7,165 (d, 1H, J=1,8 Hz); 6,671 (d, 1H, J=1,8 Hz).

50 C. *Síntesis de 5-yodo-7-cloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona*: Se adaptó el procedimiento de Foged, C. y Journal, P. (J. de Lab. Compd. y Radiopharmac. XXXI (5):365-373 (1992)). A una mezcla agitada de 2-amino-4-cloro-6-yodoanilina (366 mg, 1,253 mmol) en HCl 2 N (30 ml) se le añadió ácido oxálico (160 mg, 1,269 mmol, usado tal como se recibió) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 120-5°C durante 3 h, luego se enfrió hasta temperatura ambiente durante la noche. Se centrifugó la mezcla y se retiró la fase líquida. Se lavó el sólido rojo dos veces con agua fría (2x2 ml), se recogió mediante filtración, y se secó a 60°C a presión reducida durante 2 h, dando 300 mg de 5-yodo-7-cloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona bruta (74%), como un polvo rojo que contenía algo de impurezas (mediante RMN). Se disolvió una muestra de 300 de producto bruto en NaOH 1 N (10 ml). Se eliminó mediante filtración algo de material insoluble, y luego se acidificó el filtrado hasta pH=6, dando 260 mg de producto más puro. La cristalización en DMSO/H₂O, dio 169 mg de producto puro (42%), como microcristales rojos, p.f.: >350°C (desc. a partir de 295°C). IR (KBr, cm⁻¹) 3443, 3212, 1750, 1706, 1606, 1587, 1393. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,133 (d, 1H, J=1,5 Hz); 7,628 (d, 1H, J=1,5 Hz); 10,386 (d, 1H, J=1,5 Hz); 12,015 (d, 1H, J=1,8 Hz). HRMS: calc. para C₈H₄N₂O₂ClI (M⁺) m/z: 321,9004; hallado: 321,8995. Potencia con respecto a DCK: 28,4%.

65

ES 2 313 714 T3

Ejemplo 63

Preparación de 5-yodo-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)

5 A. *Síntesis de 4-fluoro-6-yodo-2-nitroanilina*: Se adaptó el procedimiento de Sy, W.W. (Synthetic Communications 22 (22):3215-19 (1992)). A una disolución de 4-fluoro-2-nitroanilina (312 mg, 2,0 mmol, Aldrich, usada tal como se recibió) en EtOH (40 ml) se le añadió yodo (0,508 g, 2,0 mmol, usado tal como se recibió) y Ag₂SO₄ (622 mg, 2,0 mmol, usado tal como se recibió). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante un día. La CCF (CHCl₃) de la mezcla mostró que consistía en el 40% de material de partida y el 60% de producto. Se añadió yodo (127 mg, 0,5 mmol) y Ag₂SO₄ (311 mg, 1 mmol) adicional. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante otro día, luego se eliminó mediante filtración el precipitado amarillo que se formó y se evaporó el filtrado hasta sequedad a presión reducida, dando 774 mg de 4-fluoro-6-yodo-2-nitroanilina bruta. Ésta se disolvió en diclorometano y se lavó con disolución de hidróxido de sodio al 5% (20 ml), seguido por agua. Tras la separación de las fases, se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se evaporó hasta sequedad. Se sometió a cromatografía el residuo sobre gel de sílice y se eluyó con cloroformo, dando 4-fluoro-6-yodo-2-nitroanilina bruta. Se purificó la muestra mediante CCF preparativa (eluida con cloroformo) dando 4-fluoro-6-yodo-2-nitroanilina pura (466 mg, 83%), como un polvo amarillo. RMN (¹H, CDCl₃): δ 6,538 (σ, 2H); 7,768 (q, J1=3 Hz, J2=6,9 Hz, 1H); 7,939 (q, J1=3 Hz, J2=6,9 Hz, 1H).

20 B. *Síntesis de 2-amino-4-fluoro-6-yodoanilina*: A una mezcla agitada de 4-fluoro-6-yodo-2-nitroanilina (359 mg, 1,273 mmol) en etanol (10 ml) se le añadió SnCl₂·2H₂O (1,432 g, 6,365 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación durante 0,5 h para formar una disolución transparente, y luego se continuó el reflujo durante otras 0,5 h. Se enfrió la disolución hasta temperatura ambiente y se añadió agua con hielo (20 g). Se ajustó el pH a pH ~ 7 y se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se secó el extracto sobre MgSO₄ y se evaporó hasta sequedad dando 232 mg (73%) de 2-amino-4-fluoro-6-yodoanilina como un sólido marrón. RMN (¹H, CDCl₃): δ 4,366 (s, 2H); 5,149 (s, 2H); 6,368 (tetra, 1H, J1=3 Hz, J2=6,9 Hz); 6,655 (tetra, J1=3,0 Hz, J2=6,9 Hz, 1H).

30 C. *Síntesis de 5-yodo-7-fluoro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona*: Se adaptó el procedimiento de Foged, C. y Journal, P. (J. de Lab. Compd. y Radiopharmac. XXXI (5):365-373 (1992)). A una mezcla agitada de 2-amino-4-fluoro-6-yodoanilina (232 mg, 0,92 mmol) en HCl 2 N (10 ml) se le añadió ácido oxálico (126 mg, 1,0 mmol, usado tal como se recibió) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 120-5°C durante 3 h, luego se enfrió hasta temperatura ambiente durante la noche. Se centrifugó la mezcla y se retiró la fase líquida. Se lavó el precipitado rojo con agua fría (2x2 ml), se recogió mediante filtración, y se secó a 60°C a presión reducida durante 2 h, dando 160 mg del compuesto del título bruto (57%), como un polvo rojo que contenía algo de impurezas (RMN). Se disolvió la muestra de producto bruto en NaOH 1 N (10 ml) y se eliminó mediante filtración algo del material insoluble. Se acidificó el filtrado hasta pH=6, dando 156 mg de producto purificado. La cristalización en DMSO/H₂O dio 149 mg del compuesto del título puro (51%) como microcristales rojos, p.f.: 310-2°C (cambio de color, a partir de 242°C). IR (KBr, cm⁻¹) 3431, 3350, 3062, 1743, 1718, 1606, 1518, 1400. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 6,947 (q, 1H, J1=2,7 Hz, J2=9,3 Hz); 6,963 (q, 1H, J1=2,7 Hz, J2=9,3 Hz); 10,313 (s, 1H); 12,054 (s, 1H). HRMS calc. para C₈H₄N₂O₂FI (M⁺) m/z: 305,9301; hallado: 40 305,9288. Potencia con respecto a DCK: parcialmente activo.

Ejemplo 64

Preparación de 5-yodo-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

45 A. *Síntesis de 4,5-dicloro-6-yodo-2-nitroanilina*: Se adaptó el procedimiento de Sy, W.W. (Synthetic Communications 22(22):3215-19 (1992)). A una disolución de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (4,14 g, 2,0 mmol, usada tal como se recibió) en EtOH (40 ml) se le añadió yodo (521 g, 2,05 mmol, usado tal como se recibió) y Ag₂SO₄ (622 mg, 2,0 mmol, usado tal como se recibió). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante un día (monitorizado mediante CCF), luego se eliminó mediante filtración el precipitado amarillo que se formó. Se evaporó el filtrado hasta sequedad a presión reducida dando 600 mg de 4,5-dicloro-6-yodo-2-nitroanilina bruta. Ésta se disolvió en diclorometano y se lavó con disolución de hidróxido de sodio al 5% (20 ml) seguido por agua. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se evaporó hasta sequedad. Se sometió a cromatografía el residuo sobre gel de sílice y se eluyó con cloroformo, dando el producto bruto. Éste se purificó mediante CCF preparativa (elución con cloroformo) dando 4,5-dicloro-2-yodo-6-nitroanilina pura (356 mg, 53%), como un polvo amarillo. RMN (¹H, CDCl₃): δ 6,940 (s, 2H); 8,378 (s, 1H).

60 B. *Síntesis de 1,2-diamino-4,5-dicloro-6-yodobenceno*: A una mezcla agitada de 2-nitro-4,5-dicloro-6-yodoanilina (216 mg, 0,648 mmol) en etanol (5 ml) se le añadió SnCl₂·2H₂O (730 mg, 3,24 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación durante 0,5 h para formar una disolución transparente y luego se continuó el reflujo durante otras 0,5 h. Se enfrió la disolución hasta temperatura ambiente y se añadió agua con hielo (10 g). Se ajustó el pH a pH ~7 con disolución acuosa de NaHCO₃ al 5% y se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se secó el extracto sobre MgSO₄ y se concentró hasta sequedad dando 156 mg (80%) de 1,2-diamino-4,5-dicloro-6-yodobenceno como un sólido marrón. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 4,954 (s, 2H); 5,162 (s, 2H); 6,722 (s, 1H).

65 C. *Síntesis de 5-yodo-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona*: Se adaptó el procedimiento de Foged, C. y Journal, P. (J. de Lab. Compd. y Radiopharmac. XXXI (5):365-373 (1992)). A una mezcla agitada de 1,2-diamino-4,5-dicloro-6-yodobenceno (70 mg, 0,23 mmol) en HCl 2 N (10 ml) se le añadió ácido oxálico (32 mg, 0,25 mmol,

ES 2 313 714 T3

usado tal como se recibió) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 120-5°C durante 3 h, luego se enfrió hasta temperatura ambiente durante la noche. Se centrifugó la mezcla y se lavó el sólido rojo dos veces con agua fría (2x1 ml), se recogió mediante filtración, y se secó a 60°C a presión reducida durante 2 h, dando 60 mg del compuesto del título bruto (73%), como un polvo rojo. Se disolvió la muestra en NaOH 1 N (8 ml) y se eliminó mediante filtración el material insoluble. Se acidificó el filtrado hasta pH=6, dando 46 mg de compuesto del título. La cristalización en DMSO/H₂O dio 19 mg de producto puro (23%) como microcristales rojos, p.f.: 335-8°C (la desc. comenzó a 330°C). IR (KBr, cm⁻¹): 3437, 3325, 1750, 1712, 1475, 1393. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,273 (s, 1H); 10,282 (s, 1H); 12,038 (s, 1H). HRMS, calc. para C₈H₃N₂O₂Cl₂I (M⁺) m/z: 355,8614; hallado: 355,8603. Potencia con respecto a DCK: 152%.

10

Ejemplo 65

Preparación de 5-yodo-6-nitro-7-cloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona

15 Se adaptó el método de Cheeseman, G.W.H. (J. Chem. Soc. 1170 (1962)). Se disolvió 5-yodo-7-cloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (96 mg, 0,33 mmol) en H₂SO₄ concentrado (1,0 ml) a 0°C durante 30 min. y luego se añadió KNO₃ (36 mg, 0,36 mmol, Baker) a esta disolución. Se agitó la mezcla a 0°C durante 0,5 h y luego a temperatura ambiente durante 30 h. Se vertió en agua con hielo (5 g). Apareció un precipitado y se recogió mediante filtración dando 101 mg del compuesto del título bruto. Se disolvió la muestra en KOH 1 N (5 ml) y luego se eliminó mediante filtración el precipitado rojo. Se acidificó el filtrado hasta pH=2 con HCl 4 N dando un precipitado marrón que se recogió mediante filtración y luego se secó al aire a 50°C durante 4 h. Se obtuvo compuesto del título (75 mg, 67%) como un polvo marrón. La cristalización en DMSO/H₂O produjo el compuesto puro (34 mg) como microcristales marrones, p.f.: 388-90°C. IR (KBr, cm⁻¹): 3462, 3200, 3050, 1712, 1587, 1537. RMN (¹H, DMSO-d₆): δ 7,289 (s, 1H), 10,846 (s, 1H), 12,225 (s, 1H). HRMS: calc. para C₈H₃N₃O₄ClI (M⁺) m/z: 366,8855, hallado, está pendiente. Potencia con respecto a DCK: parcialmente activo.

Ejemplo 66

30 *Preparación de 5-yodo-7-cloro-6,8-dinitro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)*

Se adaptó el método de Cheeseman, G.W.H. (J. Chem. Soc. 1170 (1962)). Se disolvió 5-yodo-7-cloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (74 mg, 0,23 mmol) en H₂SO₄ concentrado (1,0 ml) a 25°C durante 30 min. y se añadió luego KNO₃ (116 mg, 1,17 mmol, Baker) a la disolución. Se agitó la mezcla a 25°C durante 12 h y a 100°C durante 4 h. Tras enfriarse la mezcla a temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo (5 g). Apareció un precipitado y se recogió mediante filtración. Se disolvió en KOH 1 N (10 ml), se filtró, y se acidificó el filtrado hasta pH=5 con HCl 4 N dando un precipitado rojo. Éste se secó al aire a 50°C durante 4 h produciendo el compuesto del título (27 mg, 28%) como un polvo rojo oscuro, p.f.: 240-2°C (con desc., cambio de color a partir de 180-5°C). IR (KBr, cm⁻¹): 3431, 3218, 3143, 1712, 1550, 1400, 559. HRMS: calc. para C₈H₂N₄O₆ClI (M⁺) m/z: 411,8705, hallado: 411,8713. Potencia con respecto a DCK: pendiente.

Ejemplo 67

45 *Preparación de 5,8-diiodo-6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)*

Se adoptó el método de Leeson, P.D. *et al.* (J. Med. Chem. 34:1243-1252 (1991)). Se disolvió 6,7-dicloro-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (92 mg, 0,40 mmol) en H₂SO₄ concentrado (2,0 ml) a temperatura ambiente durante 30 min. y luego se añadió ICl (383 mg, 2,16 mmol, Aldrich) a esta disolución. Se agitó la mezcla a 115-20°C durante 14 h. Se enfrió hasta temperatura ambiente y se vertió en agua con hielo (10 g). Apareció un precipitado y se recogió mediante filtración. Se disolvió el precipitado en KOH 1 N (10 ml), se filtró, y se acidificó el filtrado hasta pH=5 con HCl 4 N dando a precipitado rojo. Éste se recogió mediante filtración y se secó al aire a 50°C durante 4 h produciendo el compuesto del título (147 mg, 75%) como un polvo blanco. La cristalización en DMSO/H₂O dio microcristales blancos (96 mg, 50%), p.f.: 353-4°C (desc. a partir de 315°C). IR (KBr, cm⁻¹): 3428, 3189, 3142, 1741, 1688, 1462, 1396, 579. HRMS: calc. para C₈H₂N₂O₂Cl₂I₂ (M⁺) m/z: 481,7579, hallado 481,7575. Potencia con respecto a DCK: pendiente.

Ejemplo 68

60 *Preparación de 6-yodo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)*

A. *Síntesis de 4-yodo-2-nitroanilina*: Se adaptó el procedimiento de Sy, W. W. (Synthetic Communications 22(22): 3215-19 (1992)). A una disolución de 2-nitroanilina (1,38 g, 10,0 mmol, Aldrich, usada tal como se recibió) en EtOH (100 ml) se le añadió yodo (2,54 g, 10,0 mmol, usado tal como se recibió) y Ag₂SO₄ (3,11 g, 10,0 mmol, usado tal como se recibió). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h (monitorizado mediante CCF). Se retiró el precipitado amarillo que se formó mediante filtración y se evaporó el filtrado hasta sequedad a presión reducida dando 2,74 g de producto bruto. Se disolvió la muestra en diclorometano y se lavó con disolución de hidróxido de sodio

ES 2 313 714 T3

al 5% (40 ml), seguido por agua. Se secó la fase orgánica sobre $MgSO_4$ y se evaporó hasta sequedad. Se sometió el residuo a cromatografía sobre gel de sílice y se eluyó con cloroformo. La CCF preparativa (elución con cloroformo) dio 4-yodo-2-nitroanilina pura (1,8 g, 68,0%) como un polvo amarillo. RMN (1H , $CDCl_3$): δ 4,832 (s, 2H); 6,658 (d, $J=8,7$ Hz, 1H); 7,595 (tetra, $J_1=1,5$ Hz, $J_2=8,7$ Hz, 1H); 8,442 (d, $J=1,5$ Hz, 1H).

5
B. *Síntesis de 6-yodo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona*: Se adaptó el procedimiento de Foged, C. y Journal, P. (J. de Lab. Compd. y Radiopharmac. XXXI (5):365-373 (1992)). A una mezcla agitada de 2-nitro-4-yodoanilina (1,8 g, 6,9 mmol) en etanol (40 ml) se le añadió $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (7,8 g, 34,6 mmol) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 80°C (baño de aceite a 90°C) con agitación durante 0,5 h para formar una disolución transparente y se continuó el reflujo durante otra 1,5 h. Se enfrió la disolución hasta temperatura ambiente y se añadió agua con hielo (100 g). Se ajustó el pH hasta pH ~ 7 y se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se secó el extracto sobre $MgSO_4$ y se concentró hasta sequedad dando 1,235 g (78%) de compuesto del título como un sólido marrón. A una mezcla agitada de este producto (450 mg, 1,92 mmol) en HCl 4 N (20 ml) se le añadió ácido oxálico (267 mg, 2,115 mmol, usado tal como se recibió) en una porción. Se sometió la mezcla a reflujo a 120-5°C durante 3 h, luego se enfrió hasta temperatura ambiente durante la noche. Se centrifugó la mezcla y se lavó el precipitado rojo con agua fría (2x2 ml), se recogió mediante filtración y se secó a 60°C a presión reducida durante 2 h, produciendo 140 mg (25%) de producto bruto como un polvo blanco. Se disolvió la muestra en NaOH 1 N (10 ml), se filtró y se acidificó el filtrado hasta pH=6, produciendo 130 mg de producto que se lavó con EtOH (2 ml). La cristalización en DMSO/ H_2O dio 19 mg del compuesto del título puro como microcristales blancos, p.f.: 355-7°C. IR (KBr, cm^{-1}) 3459, 3148, 1750, 1704, 1392. RMN (1H , DMSO- d_6): δ 6,727 (d, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,053 (q, $J_1=1,8$ Hz, $J_2=8,4$ Hz, 1H), 11,952 (s, 1H), 11,998 (s, 1H). HRMS: calc. para $C_8H_5N_2O_2I$ (M^+) m/z 287,9393. Hallado: 287,9390. Potencia con respecto a DCK: 4,7%.

Ejemplo 69

25 *Preparación de 6,7-dibromo-5,8-diiodo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (compuesto de referencia)*

Se adoptó el método de Leeson, P.D. *et al.* (J. Med. Chem. 34:1243-1252 (1991)). Se disolvió 6,7-dibromo-1,4-dihidro-2,3-quinoxalindiona (105 mg, 0,33 mmol) en H_2SO_4 concentrado (2,0 ml) a 0°C durante 30 min. Luego se añadió ICI (358 mg, 2,19 mmol, Baker). Se agitó la mezcla a 120°C durante 14 h y luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se vertió en agua con hielo (5 g). Se recogió el precipitado mediante filtración y se disolvió en KOH 1 N (10 ml). Se retiró un precipitado rojo mediante filtración y se acidificó el filtrado hasta pH=2 con HCl 4 N dando un precipitado blanco. Éste se recogió mediante filtración y se secó al aire a 50°C durante 4 h produciendo el compuesto del título (240 mg, > 100%) como un polvo blanco. La cristalización en EtOH dio el compuesto del título puro (140 mg, 75%), p.f.: >350°C. IR (KBr, cm^{-1}): 3437, 3287, 1718, 1593, 1550. RMN (1H , DMSO- d_6) δ 12,297 (s, 2H). HRMS: calc. para $C_8H_2N_2O_2Br_2I_2$ (M^+), m/z 569,6569. Hallado: pendiente. Potencia con respecto a DCK: pendiente.

Ejemplo 70

40 *Ensayos de unión y modelos animales que emplean 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas*

Métodos

45 A. *Ensayo de unión a [3H]-MK801 estimulada con glicina 1 μM*

Se determinó la potencia antagonista de glicina *in vitro* usando un ensayo de unión a [3H]-MK801 estimulada con glicina 1 μM . Este ensayo se aprovecha del hecho de que la unión de [3H]-MK801 al receptor de PCP dentro del poro del canal de NMDA depende de la presencia tanto de glutamato como de glicina. En ausencia de glicina pero en presencia de glutamato, [3H]-M801 no puede unirse de manera eficaz al receptor de PCP, porque el canal de NMDA permanece cerrado y el acceso de [3H]-MK801 al receptor de PCP dentro del poro de canal cerrado está fuertemente restringido.

Se realizó el ensayo usando homogeneizados de membrana de cerebro de rata que están enriquecidos en receptores de NMDA. Se prepararon las membranas tal como sigue. Se homogeneizaron cerebros de rata congelados (obtenidos de Pel-Freez, Rogers, Arkansas) en 15 volúmenes (p/v) de sacarosa 0,32 M helada. Se centrifugó el homogeneizado a 1.000 x g durante diez minutos. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó durante 20 minutos a 44.000 x g. Se suspendió el sedimento en 15 volúmenes de agua (con respecto al peso original del cerebro). Se centrifugó de nuevo el homogeneizado a 44.000 x g durante veinte minutos. Se resuspendió el sedimento en 5 volúmenes de agua y se congeló-descongeló la suspensión 2 veces. Tras el ciclo de descongelación final, se llevó la suspensión hasta 15 volúmenes con agua y se centrifugó a 44.000 x g durante veinte minutos. Se resuspendió el sedimento en 5 volúmenes de HEPES 10 mM helado, se titró hasta pH 7,4 con KOH que contenía Triton X-100 al 0,04%. Se incubaron membranas con el tampón Triton/HEPES a 37°C durante 15 minutos. Entonces se llevó el volumen hasta 15 con HEPES 10 mM helado, pH 7,4, y se centrifugó/lavó tres veces con centrifugaciones de 44.000 x g entre los lavados. Se suspendió el sedimento final en tres volúmenes de HEPES 50 mM, pH 7,4 y se determinó la concentración de proteína con un ensayo de proteína de unión a colorante convencional (Bio-Rad, Richmond, CA). Se almacenó la suspensión a -80°C hasta que se usó. Sólo se usó agua de calidad para HPLC para todos los tampones y suspensiones/lavados. Los lavados extensos fueron necesarios para eliminar tanta glicina endógena de la preparación de membrana como fuera posible.

ES 2 313 714 T3

El día del ensayo, se descongelaron las membranas preparadas previamente y se añadió tampón Tris/HCl 5 mM, pH 7,4, para dar una concentración de proteína final de 0,156 mg/ml. Para los ensayos de unión, se pipetearon 0,8 ml de membranas en tubos de polipropileno seguido de 0,033 ml de ácido 5,7-dicloroquinurénico (DCK) 15,1 μ M, 0,033 ml de glicina 30,3 μ M en tampón (o tampón solo), 0,033 ml de glutamato 303 μ M en tampón (o para los controles, 0,1 ml de PCP 1 mM en lugar de DCK/gly/glu), 0,033 ml de antagonista de glicina en tampón (o tampón solo) y 0,1 ml de tampón que contiene 200.000 cpm de [³H]-MK801. Se definió la unión no específica como la diferencia en la unión que se producía en ausencia o presencia de PCP (concentración final: 100 μ M). Para determinar el efecto de glicina 1 μ M sobre la unión de [³H]-MK801, se sustrajo la radiactividad unida en presencia de glutamato 10 μ M solo (concentración final) de la radiactividad unida en presencia tanto de glutamato 10 μ M como glicina 1 μ M (concentración final). Se añadió una concentración (final) de 500 nM de ácido 5,7-dicloroquinurénico (DCK) a todos los tubos de ensayo. Esta concentración del antagonista de glicina DCK “tamponó” la mayor parte de la glicina endógena residual que no se había eliminado mediante las etapas de lavado extenso que se habían llevado a cabo durante el procedimiento de preparación de membrana. El DCK 500 nM no interfirió con la estimulación de la unión a [³H]-MK801 que se efectuó mediante la adición de glicina exógena 1 μ M.

Se incubaron los ensayos durante 120 minutos a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se aisló la radiactividad unida a membrana de la radiactividad libre mediante filtración a vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatman que se habían pretratado con polietilenimina al 0,3%. Se llevó a cabo la filtración usando un colector de células de 48 pocillos Brandel. Se lavaron las membranas filtradas tres veces con 3 ml cada una de tampón helado. Se transfirieron los filtros a viales de centelleo y se añadieron 5 ml del cóctel de centelleo. Se agitaron los viales durante la noche y se contó la radiactividad mediante espectroscopía de centelleo líquido. Se realizaron los ensayos por triplicado y se realizaron todos los experimentos al menos tres veces.

Se construyeron curvas de respuesta a dosis de inhibición usando concentraciones crecientes de antagonistas de glicina de desde 5 nM hasta 330 μ M. Se determinaron los valores de CI_{50} para compuestos activos en la inhibición de la unión a [³H]-MK801 estimulada con glicina 1 μ M mediante representación gráfica asistida por ordenador de las curvas de inhibición y la interpolación. Cuando se encontró que los compuestos inhibían la unión a [³H]-MK801 estimulada con glicina, se llevaron a cabo experimentos para determinar si la inhibición de la unión a [³H]-MK801 estimulada con glicina estaba realmente mediada en el sitio de unión a glicina del receptor de NMDA. En estos experimentos, una concentración fija de antagonista suficiente para producir una inhibición >95% de la unión a [³H]-MK801 estimulada con glicina 1 μ M se incubó con las membranas sin nada de glicina adicional (por encima de 1 μ M) y en presencia de concentraciones crecientes de glicina adicional (de 2 μ M a 1 μ M). Si la inhibición de la unión a [³H]-MK801 mediante el fármaco en presencia de glicina 1 mM se revirtió completamente añadiendo concentraciones crecientes de glicina, entonces la inhibición de unión a [³H]-MK801 estaba mediada por el fármaco que actúa como antagonista en el sitio de unión a glicina del receptor de NMDA.

Tras construir curvas de respuesta a dosis de inhibición y la determinación de la reversibilidad de glicina, se calcularon los valores de K_i para los antagonistas de glicina usando la ecuación de Cheng y Prusoff que emplea los valores de CI_{50} determinados experimentalmente, la concentración conocida de glicina en el ensayo (1 μ M) y la afinidad conocida de la glicina para el sitio de unión a glicina del receptor de NMDA (100 nM).

B. Ensayo de unión al radioligando [³H]-AMPA

Se usaron los mismos homogeneizados de membrana de cerebro de rata para el ensayo de unión a [³H]-MK801 estimulada con glicina 1 μ M para este ensayo. El día del ensayo se descongelaron las membranas congeladas (preparadas tal como se describió anteriormente) y se diluyeron con tampón Tris/HCl 30 mM que contenía CaCl₂ 2,5 mM y KSCN 100 mM, pH 7,4, para dar una concentración de membrana final de 1,25 mg/ml de proteína de membrana. Para el ensayo de unión, se añadieron 0,8 ml de homogeneizado de membrana a los tubos de polipropileno seguido de 0,033 ml de fármaco y 0,067 ml de tampón (o para los controles de 0,1 ml de tampón solo) y 0,1 ml de tampón que contenía 200.000 cpm de [³H]-AMPA. Se incubó en ensayo durante 30 minutos en hielo. Se separó la radiactividad unida de la radiactividad libre mediante filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman (pretratados con polietilenimina al 0,3%) usando un colector de células de 48 pocillos Brandel.

Se lavaron las membranas filtradas tres veces con 3 ml cada una de tampón helado. Se transfirieron los filtros a viales de centelleo y se añadieron 5 ml de cóctel de centelleo. Se agitaron los viales durante la noche y se contó la radiactividad mediante espectroscopía de centelleo líquido. Se determinó la unión no específica mediante la radiactividad que permaneció unida a las membranas en presencia de glutamato 10 mM. Se construyeron curvas de respuesta a dosis de inhibición añadiendo concentraciones crecientes de fármaco desde 10 nM hasta 100 μ M.

C. Ensayo de unión al radioligando [³H]-cainato

Se usó la misma preparación de membrana que la usada para el ensayo de unión a [³H]-AMPA. El día del ensayo se descongelaron las membranas de cerebro de rata congeladas y se añadió tampón Tris/HCl 5 mM, pH 7,4, para dar una concentración final de 0,5 mg/ml de proteína de membrana. Para el ensayo de unión, se añadieron 0,8 ml de homogeneizado de membrana a tubos de polipropileno seguido de 0,033 ml de fármaco y 0,067 ml de tampón (o para los controles de 0,1 ml de tampón solo) y 0,1 ml de tampón que contenía 200.000 cpm de [³H]-cainato. Se incubó el

ES 2 313 714 T3

ensayo durante 2 horas en hielo. Se separó la radiactividad unida de la radiactividad libre mediante filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman (pretratados con polietilenoimina al 0,3%) usando un colector de células de 48 pocillos Brandel. Se lavaron las membranas filtradas tres veces con 3 ml cada una de tampón helado. Se transfirieron los filtros a viales de centelleo y se añadieron 5 ml de cóctel de centelleo. Se agitaron los viales durante la noche y se contó la radiactividad mediante espectroscopía de centelleo líquido. Se determinó la unión no específica mediante la radiactividad que permaneció unida a las membranas en presencia de glutamato 10 mM. Se construyeron curvas de respuesta a dosis de inhibición añadiendo concentraciones crecientes de fármaco de desde 250 nM hasta 330 μ M.

10 D. Evaluación de la eficacia de antagonistas de glicina para inhibir la neurotoxicidad del glutamato en un sistema de cultivo celular de neuronas de la corteza cerebral de rata

Se usó un modelo de excitotoxicidad modificado según el desarrollado por Choi (Choi, D.W., J. Neuroscience 7:357 (1987)) para someter a prueba la eficacia de antiexcitotóxica de los antagonistas de glicina novedosos. Se extrajeron los fetos embrionarios de rata de 19 días de ratas embarazadas el mismo tiempo. Se extrajeron los cerebros de los fetos y se disecó la corteza cerebral. Se disociaron las células de la corteza disecada mediante una combinación de agitación mecánica y digestión enzimática según el método de Landon y Robbins (Methods in Enzymology 124:412 (1986)). Se hicieron pasar las células disociadas a través de un tamiz Nitex de 80 micras y se valoró la viabilidad de las células mediante azul trípano. Se cultivaron en placa las células en placas recubiertas con poli-D-lisina y se incubaron a 37°C en una atmósfera que contenía el 91% de O₂/el 9% de CO₂. Seis días después, se añadió fluoro-d-uracilo durante dos días para suprimir el crecimiento celular no neural. En el día 12 de cultivo, se expusieron los cultivos neuronales primarios a glutamato 100 μ M durante 5 minutos con o sin dosis crecientes de antagonista de glicina u otros fármacos. Tras 5 minutos se lavaron los cultivos y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Se cuantificó el daño en las células neuronales midiendo la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) que se había liberado en el medio de cultivo. Se midió la actividad de la LDH según el método de Decker *et al.* (Decker *et al.*, J. Immunol. Methods 15:16 (1988)).

30 E. Valoración de la actividad anticonvulsiva de antagonistas de glicina en el modelo audiogénico de convulsiones en ratones DBA-2

Se obtuvieron ratones DBA-2 de Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine. Estos ratones a una edad de <27 días desarrollan una convulsión tónica en el plazo de 5-10 segundos y mueren cuando se exponen a un sonido de 14 kHz (onda sinusoidal) a 110 dB (Lonsdale, D., Dev. Pharmacol. Ther. 4:28 (1982)). Se definió la protección frente a las convulsiones cuando los animales inyectados con el fármaco 30 minutos antes de la exposición al sonido no desarrollaban una convulsión y no morían durante una exposición de 1 minuto al sonido. Se usaron ratones DBA-2 de 21 días de edad para todos los experimentos. Siempre se administraron los compuestos por vía intraperitoneal en cualquiera de solución salina, DMSO o polietilenglicol-400. Siempre se incluyeron controles de disolvente apropiados en cada experimento. Se construyeron curvas de respuesta a dosis administrando dosis crecientes de fármaco de desde 1 mg/kg hasta 100 mg/kg. Cada grupo de dosis (o control de disolvente) consistía en al menos seis animales.

40 F. Valoración de la eficacia anticonvulsiva de fármacos novedosos en la prueba de convulsiones inducidas por pentilentetrazol (PTZ)

Los ratones Swiss/Webster, cuando se les inyecta PTZ 50 mg/kg (i.p.) desarrollan una convulsión clónica mínima de aproximadamente 5 segundos de duración en el plazo de 5-15 minutos tras la inyección de fármaco. Se definió la eficacia anticonvulsiva de un fármaco de antagonista de glicina (u otro) como la ausencia de una convulsión cuando se administraba un fármaco 30 minutos antes de la aplicación de PTZ y no se desarrollaba una convulsión durante hasta 45 minutos tras la administración de PTZ. Siempre se administraron el antagonista de glicina u otros fármacos por vía intraperitoneal en cualquiera de solución salina, DMSO o polietilenglicol-400. Siempre se incluyeron controles de disolvente apropiados en cada experimento. Se construyeron curvas de respuesta a dosis administrando dosis crecientes de fármaco de desde 1 mg/kg hasta 100 mg/kg. Cada grupo de dosis (o control de disolvente) consistía en al menos seis animales.

55 G. Valoración de la eficacia de antagonistas de glicina para proteger ratones frente a la muerte inducida por NMDA

Quando se inyectan los ratones con N-metil-D-aspartato (NMDA) 200 mg/kg i.p., los animales desarrollarán convulsiones seguido de muerte en el plazo de 5-10 minutos. Se sometieron a prueba antagonistas de glicina para determinar su capacidad para evitar la muerte inducida por NMDA administrando los fármacos i.p. 30 minutos antes de la aplicación de NMDA. Siempre se administraron el antagonista de glicina u otros fármacos por vía intraperitoneal en cualquiera de solución salina, DMSO o polietilenglicol-400. Siempre se incluyeron controles de disolvente apropiados en cada experimento. Se construyeron curvas de respuesta a dosis administrando dosis crecientes de fármaco de desde 1 mg/kg hasta 100 mg/kg. Cada grupo de dosis (o control de disolvente) consistía en al menos seis animales.

ES 2 313 714 T3

H. Valoración de los efectos secundarios atáxicos en ratones mediante la prueba de ataxia con Rotorod

Se evaluó el grado de descoordinación motriz mediante el uso de una noria Rotorod para ratón convencional (Hugo Basile, Varese, Italia). Se aclimatan los ratones a la noria colocándolos sobre la misma antes del verdadero experimento. Se define la coordinación motriz normal como la capacidad de cada ratón de permanecer en la Rotorod de manera consecutiva durante un tiempo definido arbitrariamente (1 min.). Esto sirve como la base para evaluar el efecto de cada fármaco sobre la descoordinación motriz. Véase, Dar, M.S., J. Pharm. Pharmacol. 40:482-487 (1988); Dar, M.S. *et al.*, Life Sci. 33:1363-1374 (1983); y Dar y Wooles, Life Sci 39:1429-1437 (1986). Se inyectaron los ratones con cualquier vehículo (DMSO), 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona o 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona disuelta en DMSO a dosis de 1-300 mg/kg (i.p.; 6 animales por dosis de fármaco o control de vehículo). Treinta minutos tras la inyección, se colocaron los ratones en la noria Rotorod. Se hizo funcionar la noria a una velocidad de 6 rpm. Se consideró que los animales que pudieron permanecer en la noria durante 60 segundos no tenían una descoordinación motriz significativa. Se designó la dosis tóxica $_{50}$ (DT $_{50}$) como la dosis de fármaco a la que el 50% de los animales cayeron de la noria Rotorod en el plazo de menos de 60 segundos.

Resultados

La tabla II muestra los resultados de los ensayos de unión al sitio de unión a glicina, los receptores de AMPA y cainato con 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (n° 1) y el compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (n° 2).

TABLA II				
Fármaco	K _i (glicina) (μM)		K _i (AMPA) (μM)	K _i (cainato) (μM)
	Rata	Cobaya		
N° 1	0,008	-	20	92
N° 2*	0,8	0,4	21	218
N° 13	0,006	-	3	20

* Compuesto de referencia.

La tabla III muestra los resultados de los modelos animales anticonvulsivos *in vivo* que emplean los compuestos n° 1, n° 2 y n° 13. (convulsiones audiogénicas en ratones DBA-2; convulsiones inducidas por pentilentetrazol en ratones Swiss/Webster; y convulsiones/muerte inducidos por NMDA en ratones Swiss/Webster).

Tabla III			
Fármaco	DE ₅₀ /DBA (mg/kg) (i.p.)	DE ₅₀ /PTZ (mg/kg) (i.p.)	DE ₅₀ /NMDA (mg/kg) (i.p.)
N° 1	5	No activo	20
N° 2*	17	17	No activo
N° 13	10	-	-

* Compuesto de referencia.

ES 2 313 714 T3

La tabla IV muestra los datos de unión, los resultados del modelo animal anticonvulsivo *in vivo* y los resultados de la prueba de eficacia neuroprotectora (*in vitro*) para otras 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas:

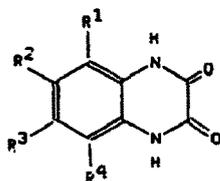


Tabla IV

Fármaco	R1	R2	R3	R4	K _i (Gly) (μ M)	K _i (AMP) (μ M)	K _i (cai) (μ M)	ED ₅₀ (DBA-2) mg/kg	CI ₅₀ de cult., cel., (μ M)
N° 1	NO ₂	Cl	Cl	H	0,008	20	92	5	0,3
N° 2**	Cl	H	CF ₃	H	0,8/ 0,4	21	218	17	15
N° 3**	Cl	NO ₂	CF ₃	H	0,2	2,2	35	inactivo	n.t.
N° 4**	Cl	H	CF ₃	NO ₂	0,4	2,2	35	inactivo	n.t.
N° 5*,**	Cl	H	Cl	H	1	34	148	9	12
N° 6**	Cl	F	F	H	2,3	84	200	n.t.	inactivo
N° 7	Br	F	F	H	2,5	>330	44	30	27
N° 8**	F	F	F	F	2,8	92	>330	9	29
N° 9***	Cl	H	F	H	9	>330	225	14	38
N° 10**	Br	H	Br	H	9	46	130	30	22
N° 11**	Br	H	CF ₃	H	12	26	55	70	13
N° 12***	Br	H	F	H	16	290	196	21	12
N° 13	NO ₂	Br	Br	H	0,006	3	22	10	0,3

* Los respectivos isómeros 6,7 son inactivos como anticonvulsivos *in vivo* y por tanto no penetran en la barrera sangre/cerebro.

** Compuestos de referencia.

ES 2 313 714 T3

La tabla V muestra los resultados de un ensayo *in vitro* que emplea un modelo de excitotoxicidad que implica cultivos de células cerebrales que muestra que los compuestos n° 1 y n° 2 evitan la muerte de células nerviosas.

5

Tabla V	
Fármaco	CI ₅₀ (μM)
N° 1	0,3
N° 2*	15
N° 13	0,3

10

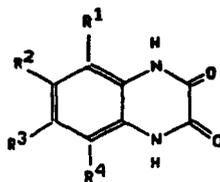
15

* Compuesto de referencia

20

La tabla VI muestra los resultados de las pruebas *in vivo* de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas 6,7-disustituidas (todos los compuestos de referencia) en el modelo de convulsiones audiogénicas de DBA-2.

25



30

Tabla VI					
Fármaco	R1	R2	R3	R4	DE ₅₀ mg/kg
N° 5	H	Cl	Cl	H	> 100
N° 9	H	Cl	F	H	> 100
N° 12	H	Br	F	H	> 100
N° 14	H	NO ₂	CF ₃	H	> 100
N° 15	H	NO ₂	NO ₂	H	> 100
N° 16	H	F	F	H	> 100
N° 17	H	CN	NO ₂	H	> 100

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 714 T3

La tabla VII muestra los resultados de ciertas 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas N-sustituidas 6,7-disustituidas (todos los compuestos de referencia) en el ensayo de unión [³H]-MK801 estimulada con glicina.

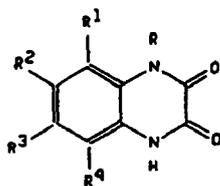


Tabla VII

Fármaco	R	R1	R2	R3	R4	K _i (glicina) (nM)
N° 18	CH ₂ COOH	H	H	H	H	450
N° 19	CH ₂ COOH	H	Br	Br	H	250
N° 20	CH ₂ COOH	H	Cl	Cl	H	180
N° 21	NH ₂	H	Br	Br	H	530
N° 22	NH ₂	H	Cl	Cl	H	2000

Ejemplo 71

Protección isquémica global con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia)

Se llevó a cabo una serie de diferentes evaluaciones en dosis de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona para determinar la actividad biológica de este compuesto tanto en jerbos normales como en animales expuestos a 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral. Véase el esquema VII.

(Esquema pasa a página siguiente)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Esquema VII

Modelo de isquemia en jерbo

Prueba de comportamiento locomotor



1. Cirujia para exponer arterias carótidas
2. Recuperación durante 48 h
3. Oclusión de arterias carótidas (5 minutos, animales no anestesiados)

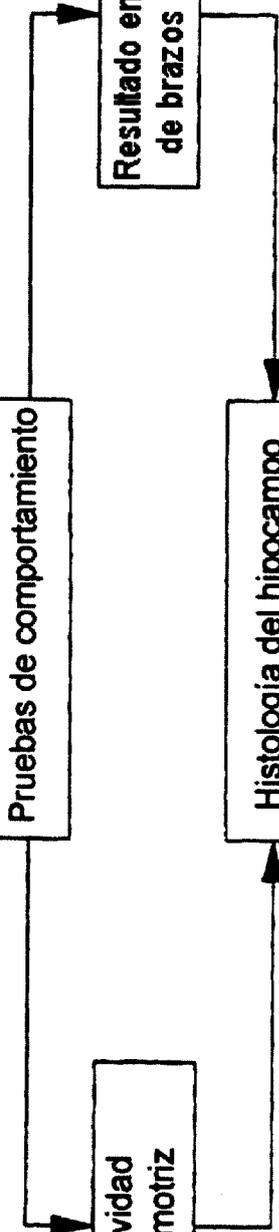


Pruebas de comportamiento

Actividad locomotriz

Resultado en laberinto de brazos radiales

Histología del hipocampo



ES 2 313 714 T3

Estos estudios se llevaron a cabo en animales que estaban conscientes y a los que no se les había administrado ninguno otro agente farmacológico. Se instrumentaron previamente los jerbos 48 horas antes de la isquemia para permitir la eliminación completa del anestésico pentobarbital que se emplea. Cuando se sometieron a prueba con fármacos, se les administraron a los animales inyecciones i.p. de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona o vehículo. En el caso de inyecciones múltiples, se les administraron a los animales inyecciones i.p. con 2 horas de diferencia y se administró la inyección final 30 minutos antes del periodo isquémico o en el caso de un tratamiento posterior, se les administraron a los animales inyecciones a 30 minutos, 2 horas, 4 horas y 6 horas tras la reperusión isquémica.

Con el fin de valorar la actividad farmacológica directa o la actividad potencial de este compuesto, se les inyectó a jerbos novatos o bien solución salina o bien diferentes dosis de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se valoraron los cambios de comportamiento usando una cámara de actividad locomotriz de haz luminoso que es un área con un diámetro circular de dos pies con detección con haz luminoso. Los animales se colocan individualmente en las cámaras con un diámetro de 2 pies. Las cámaras están alojadas en un armario que está cerrado y se reduce el ruido usando tanto un generador de ruido blanco de fondo como un ventilador. Los animales se colocan en estas cámaras en el caso de la evaluación farmacológica inicial durante un periodo de 6 horas y se acumula la actividad total durante cada hora sucesiva usando los sistemas de control por ordenador.

La solución salina dio como resultado una tasa elevada inicial de actividad tal como se demuestra en la figura 1, mostrando los animales control un nivel de actividad en la primera hora de aproximadamente 1600 cuentas. Este nivel de actividad control es típico para el jervo en estas condiciones experimentales. A medida que avanzó la sesión, los animales redujeron su actividad exploradora y en el periodo terminal la actividad se redujo hasta aproximadamente 250 cuentas por hora.

En todo el intervalo de dosis sometidas a prueba (1,0-32 mg/kg) la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no produjo ningún cambio consecuente en la actividad locomotriz espontánea. El comportamiento control se caracterizaba por un alta tasa de actividad locomotriz en la primera hora de la sesión y una tasa de actividad marcadamente reducida en la última hora de la sesión de 6 horas. La observación de los jerbos, además de las pruebas de actividad locomotriz, indicó que las dosis tan altas como 32 mg/kg no alteraban el comportamiento normal. La 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona a 1,0 mg, 3,2 mg/kg, 10 mg/kg y 32 mg/kg (figuras 2-5) no tenía un efecto significativo ni sobre la tasa exploradora inicial ni la tasa terminal de exploración. Hubo algunas diferencias menores que indicaban que si la dosis se aumentaba adicionalmente, podía haber de hecho algunos efectos depresivos en el comportamiento. A la dosis de 32 mg/kg la actividad exploradora inicial era de aproximadamente 850 a 900 cuentas en comparación con 1200 cuentas en el grupo control de solución salina (figura 5). A medida que avanzaba el tiempo, la actividad se redujo de una manera similar al control de solución salina y finalmente se redujo hasta un nivel significativamente bajo (en comparación con la primera hora), que era similar en toda una variedad de diferentes dosis. Por tanto, la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no parece tener ni efecto depresivo ni estimulante (similar a PCP) sobre el comportamiento significativo tal como se observa con los antagonistas del receptor de NMDA MK801 (véase la patente estadounidense número 4.888.347) y CGS-19755 (cis-4-fosfono-metil-2-piperidin-carboxilato). Todos los animales parecen tolerar las inyecciones hasta 32 mg/kg bastante bien y no mostraban ninguna evidencia de toxicidad grave. Todos los animales sobrevivieron durante un periodo de 7 días tras estas dosis.

En la siguiente fase de la evaluación de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, se pretrataron los jerbos con dosis variables del compuesto y entonces se expusieron a un periodo de oclusión de la carótida bilateral de cinco minutos. Tras el inicio de la reperusión, se colocaron los animales en el aparato de pruebas de la actividad locomotriz circular y se monitorizó la actividad al comienzo de la primera hora tras la reperusión durante las cuatro horas posteriores.

Los animales control no expuestos a isquemia y a los que se les administraron inyecciones de solución salina antes de colocarlos en la cámara de actividad locomotriz mostraron un patrón característico de actividad que en la primera hora de actividad locomotriz era sustancialmente mayor que durante todas las demás horas y se reducía progresivamente a lo largo de las cuatro horas hasta un valor muy bajo. La figura 6 (símbolos en blanco) muestra este patrón control de actividad que es típico de la mayoría de roedores cuando se colocan en un entorno de pruebas de actividad locomotriz novedoso. A diferencia de la reducción progresiva en la actividad a lo largo del periodo de pruebas de cuatro horas, los animales control que se expusieron a cinco minutos de isquemia cortical mostraron un patrón completamente diferente de actividad locomotriz. Durante la primera hora hubo una reducción significativa en la actividad que fue seguida de un aumento progresivo en el que la actividad durante la cuarta hora era diez veces mayor que la mostrada por animales no expuestos a oclusión de la carótida (figura 6, símbolos en negro). Estos resultados son típicos y son un resultado fiable de las alteraciones provocadas por cinco minutos de oclusión de la carótida bilateral en el jervo.

Se pretrataron grupos separados de jerbos con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona 30 minutos antes del inicio de la oclusión de la carótida y entonces se pusieron en actividad locomotriz tras una hora de reperusión. La 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona evitó tanto la disminución como el aumento postisquémicos en la actividad (figuras 7-10, símbolos en negro). Las disminuciones postisquémicas en la actividad eran próximas a cero durante la primera hora tras la reperusión. El pretratamiento con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona redujo de manera fiable o evitó esta depresión temprana en el comportamiento. Además,

la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona evitó la estimulación postisquémica del comportamiento. Todas las dosis evitaron la estimulación de la actividad que se produce de manera fiable durante la 3ª y 4ª horas tras la reperfusión (véanse las figuras 7-10). Estos cambios en el patrón postisquémico de comportamiento durante la primera y cuarta horas de evaluación del periodo postisquémico se presentan en las figuras 11 y 12. En particular, la figura 12 muestra claramente la dramática reducción en la hiperactividad postisquémica durante la cuarta hora de valoración mediante dosis de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona a partir de 0,32-32 mg/kg.

Para fines de comparación se evaluaron también los efectos de una serie de pretratamientos i.p. con el antagonista de glicina no de estriquina 3-amino-1-hidroxipirrolid-2-ona (HA966). Cuando se administraron dosis de HA966 1 hora antes del inicio de la isquemia hubo una separación clara entre las dosis inactivas y activas. 1 mg/kg de HA966 pareció o bien no tener ningún efecto o bien exacerbar los cambios de comportamiento que se producían tras la reperfusión cuando se sometieron a prueba los animales para determinar la actividad locomotriz 24 horas tras la reperfusión. De manera similar, cuando se sometieron a prueba 3,2 mg/kg de HA966, hubo un cambio incluso mayor en la actividad locomotriz en el que los animales control mostraron un nivel de actividad total de aproximadamente 3361 cuentas/h. Cuando se aumentó la dosis ligeramente se observó una protección significativa frente a los cambios de comportamiento inducidos por la oclusión de la carótida bilateral. Tanto 5,6 mg/kg como 10 mg/kg de HA966 parecían ser eficaces a la hora de evitar los aumentos postisquémicos en la actividad a 24 horas. Por tanto, parece que tanto la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona como HA966 son eficaces a la hora de reducir este cambio de comportamiento particular que es característico de la respuesta isquémica cerebral en el jерbo.

Después de completarse las evaluaciones de pretratamiento de dosis única se evaluaron los jerbos con múltiples inyecciones de 32 mg/kg de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se administraron las dosis i.p. a 6 horas, 4 horas, 2 horas y 30 minutos antes del inicio de los 5 minutos de isquemia. En la modalidad de postratamiento se administraron dosis de 32 y 100 mg/kg 30 minutos, 2 horas, 4 horas y 6 horas tras el inicio de la reperfusión.

A diferencia de los compuestos de referencia 6-trifluorometil-7-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5,7-dinitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (MNQX), se observó un efecto significativo de postratamiento de dosis única con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. El tratamiento postisquémico con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona evitó dependiendo de la dosis un aumento en la actividad locomotriz (figura 13). Además, el postratamiento múltiple dio como resultado una reducción significativa en la hiperactividad tras la reperfusión (figura 14). Este nivel de actividad era significativamente diferente del postratamiento de dosis única con la misma dosis.

A 24 horas se evaluaron todos los animales para determinar diferencias en el comportamiento de patrulla usando un laberinto de 8 brazos radiales. En este procedimiento, se colocaron los animales en la cámara de inicio central del laberinto, se retiró la barrera y se registraron la cantidad de tiempo y el número de veces que el animal comete un error antes de completar la exploración en los 8 brazos del laberinto. Se definió un error como volver a visitar un brazo entrando el animal en la medida de todo el cuerpo sin incluir la cola. Si el animal perseveró o no abandonó el brazo en más de cinco minutos, se terminó la sesión. En los casos de todas estas evaluaciones los animales nunca superaron el punto de corte de cinco minutos y se exploraron los 8 brazos satisfactoriamente con diferentes grados de errores. En la población control de los animales, el número de errores y la exploración del laberinto sin experiencia previa (novatos) fue de aproximadamente 6 errores. Éste es un valor promedio para un N de 28 jerbos. Tras 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral y pruebas a 24 horas, los jerbos cometieron un número de errores promedio de 21. Cuando se pretrataron los animales con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, hubo una reducción significativa en el número de errores cometidos. (X=14) Estos datos se presentan en la figura 15 e indican que no sólo hay un cambio en la actividad locomotriz a 24 horas producido por la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona cuando se administra como un pretratamiento antes de 5 minutos de isquemia, sino que también parece haber un ahorro significativo de los cambios de comportamiento que se inducen en el resultado en el laberinto de brazos radiales.

El tratamiento posterior con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidro-quinoxalin-2,3-diona 32 mg/kg redujo también el empeoramiento en la memoria a corto plazo 24 horas tras la isquemia/reperfusión. Éste es un hallazgo único entre los compuestos que se han sometido a prueba en este modelo. Además, la falta de un efecto de comportamiento manifiesto podría sugerir que se garantizan pruebas más agresivas en éstos y otros modelos *in vivo*. La falta de una respuesta tóxica manifiesta, con dosis altas de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sugiere que puede tener un margen de seguridad que lo convertiría en un buen candidato terapéutico.

Se evaluaron los efectos de 5 minutos de oclusión de la carótida bilateral sobre la muerte de células neuronales en el hipocampo dorsal en animales 7 días tras lesión por isquemia y reperfusión. Estudios previos han demostrado que la degeneración neuronal empieza a producirse aproximadamente 3 días tras la isquemia cerebral. A los 7 días aquellas neuronas que se han visto afectadas y experimentarán citolisis y o bien tendrán una degeneración completa o bien serán fácilmente visibles como núcleos oscuros y núcleos desplazados con citoplasma eosinófilo con núcleos picnóticos. La lesión con 5 minutos de isquemia está restringida esencialmente dentro del hipocampo a la región CA1 del hipocampo dorsal. La zona lateral intermedia del asta no se ve afectada y el giro dentado y/o en CA3 no muestra patología. Se anestesiaron los jerbos el día 7 tras la isquemia con 60 mg/kg de pentobarbital. Se prefundieron transcárdialmente los cerebros con solución salina helada seguido de paraformaldehído tamponado (al 10%). Se extrajeron los cerebros, se incrustaron y se realizaron cortes. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se determinaron recuentos de células

neuronales en cuanto al número de núcleos neuronales/100 micrómetros. La figura 16 indica que los animales control normales (no expuestos a lesión por isquemia y reperfusión) no mostraron ningún cambio significativo en los núcleos de densidad normal dentro de esta región. La exposición a cinco minutos de oclusión de la carótida bilateral dio como resultado una reducción significativa en el número de núcleos presentes en la región CA1. En general, esta lesión da como resultado una necrosis irregular en lugar de una necrosis confluyente que se observa si se emplean 10 minutos de isquemia. El pretratamiento con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona a dosis de 0,32-32 mg/kg produce una protección significativa de la degeneración neuronal del hipocampo (figura 16). El postratamiento con 3,2 mg/kg redujo significativamente el grado de pérdida celular en la CA-1 tras la lesión por isquemia y reperfusión (figura 17).

Resumen de los resultados

1. El compuesto de referencia 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no mostró efectos secundarios de comportamiento significativos en controles normales.
2. El pretratamiento con dosis de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona de 0,32 a 32 mg/kg produjo una protección relacionada con la dosis frente a los efectos de comportamiento de 5 min. de isquemia cerebral.
3. Una dosis de 3,2 mg/kg de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona aplicada tras la isquemia evitó un daño postisquémico en las células CA-1 del hipocampo. Cuatro dosis de 0,32-32 mg/kg aplicadas antes de la isquemia evitaron un daño postisquémico en las células del hipocampo en la región CA-1.
4. La protección de comportamiento era más sensible que la protección frente al daño celular del hipocampo.
5. El postratamiento con 32 mg/kg de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona redujo los efectos de comportamiento, y redujo o evitó las consecuencias histopatológicas de una oclusión de la arteria carótida bilateral de 5 min.

Conclusión

De los tres compuestos de referencia sometidos a prueba (6-Nitro, 7CF₃-QX; 5,7-dinitro-QX, 5-Cl-7-CF₃-QX), la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es con diferencia el mejor compuesto para la protección frente a isquemia en el jerbo. Este compuesto carecía de efectos directos significativos sobre el comportamiento. Sin embargo, era un protector potente cuando se administraba antes de la isquemia. Además, las dosis de postratamiento y de pretratamiento múltiple proporcionaron una protección significativa. La protección del comportamiento se extendía tanto a la actividad locomotriz como al resultado en el laberinto de brazos radiales. De acuerdo con esta protección del comportamiento robusta, la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona también protegía frente al daño neuronal.

Ejemplo 72

Efectos de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia), 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre el dolor crónico

Se sabe que los receptores de NMDA están implicados de manera crítica en el desarrollo del dolor persistente tras daño tisular y de los nervios. Se ha mostrado que el daño tisular tal como el provocado inyectando una cantidad pequeña de formalina por vía subcutánea en la pata trasera de un animal de prueba produce un aumento inmediato de glutamato y aspartato en la médula espinal (Skilling, S.R., *et al.*, J. Neurosci. 10:1309-1318 (1990)). La administración de bloqueantes de receptores de NMDA reduce la respuesta de las neuronas del asta posterior de la médula espinal tras la inyección de formalina (Dickenson y Aydar, Neuroscience Lett. 121: 263-266 (1991); Haley, J.E., *et al.*, Brain Res. 518:218-226 (1990)). Estas neuronas del asta posterior son críticas a la hora de transportar la señal de dolor desde la médula espinal hasta el cerebro y una respuesta reducida de estas neuronas es indicativa de una reducción en el dolor percibido por el animal de prueba al que se le ha infligido dolor mediante inyección de formalina subcutánea.

Debido a la observación que los antagonistas de receptores de NMDA pueden bloquear la respuesta de las neuronas del asta posterior inducida mediante inyección de formalina subcutánea, los antagonistas de receptores de NMDA tienen potencial para el tratamiento de dolor crónico tal como el dolor que se provoca mediante cirugía o mediante amputación (dolor en miembro fantasma) o mediante ocasionamiento de otras heridas (dolor en heridas). Sin embargo, el uso de antagonistas de NMDA convencionales tales como MK801 o CGS 19755, a la hora de evitar o tratar el dolor crónico, está limitado gravemente por los efectos secundarios de comportamiento similares a PCP adversos que se provocan por estos fármacos. Se ha encontrado que los antagonistas a base de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona del sitio de unión a glicina del receptor de NMDA que son el sujeto de esta invención son altamente eficaces a la hora de evitar el dolor crónico en ratones inducido inyectando formalina por vía subcutánea en la pata trasera de los animales. Ya que los antagonistas de glicina a base de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona de esta invención están libres de efectos secundarios similares a PCP, estos fármacos son altamente útiles a la hora de evitar o tratar el dolor crónico sin provocar efectos secundarios de comportamiento adversos similares a PCP.

ES 2 313 714 T3

Se alojaron cinco ratones macho Swiss/Webster que pesaban 25-35 gramos en una jaula con acceso libre a alimento y agua y se mantuvieron en un ciclo de luz de 12 horas (aparición de luz a las 08,00 h). Se disolvieron 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (1-40 mg/ml), 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (5-40 mg/ml) o 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (1-40 mg/ml) en DMSO. Se usó DMSO como control de vehículo. Se inyectaron todos los fármacos por vía intraperitoneal (1 μ l/g). Se realizó la prueba de formalina tal como se describió (Dubuisson y Dennis, Pain 4:H161-174 (1977)). Se observaron los ratones en un cilindro de plexiglás, de 25 cm de diámetro y 30 cm de alto. Se inyectó la superficie plantar de una pata trasera por vía subcutánea con 20 μ l de formalina al 5%. El grado de dolor se determinó midiendo la cantidad de tiempo que el animal pasaba lamando la pata inyectada con formalina durante los siguientes intervalos de tiempo: 0-5' (fase temprana); 5'-10', 10'-15' y 15'-50' (fase tardía). Para someter a prueba si los dos antagonistas de glicina evitaban el dolor crónico en los animales de prueba, se inyectaron un vehículo (DMSO) o fármacos disueltos en vehículo a dosis de 1 mg/kg a 40 mg/kg por vía intraperitoneal 30 minutos antes de la inyección de formalina. Durante cada dosis de control de vehículo o fármaco se usaron al menos seis animales.

La figura 18 muestra que, en comparación con el control de vehículo, la inyección intraperitoneal de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona 30 minutos antes de la inyección de formalina en la pata trasera inhibía significativamente el dolor crónico inducido por formalina de una manera dependiente de la dosis tal como se determinó mediante la reducción del tiempo que el ratón pasó lamando la pata trasera inyectada con formalina provocado por el aumento de dosis del antagonista de glicina. La 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona inhibía el lamido inducido por formalina a todas las dosis (1-40 mg/kg) tanto en la fase temprana como en la tardía.

La figura 19 muestra que, en comparación con el control de vehículo, la inyección intraperitoneal de 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona también inhibía el dolor inducido por formalina tal como se evalúa mediante la inhibición del tiempo que el animal pasaba lamando la pata trasera inyectada con formalina. La 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona inhibía el lamido inducido por formalina a dosis de 5-40 mg/kg en las fases tardías mientras que se inhibió la fase temprana mediante dosis de 10-40 mg/kg. La 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona mostró una DE_{50} de 5 mg/kg a la hora de evitar el dolor inducido por formalina en el ratón.

Tal como se muestran en las figuras 20A y 20B, la 6,7-dibromo-5-nitro-dihidroquinoxalin-2,3-diona inhibía el lamido inducido por formalina de manera dependiente de la dosis tanto en la fase temprana (0-5 minutos; figura 20A) de la respuesta al dolor (lamido) como en la fase tardía (15-50 minutos; figura 20B) de la respuesta de lamido por dolor indicando una eficacia antinociceptiva potente en este modelo animal de dolor crónico.

Estos resultados demuestran que las 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-diona y 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona son eficaces a la hora de tratar el dolor crónico inducido mediante inyección de formalina subcutánea. Puesto que ambos compuestos son antagonistas en el sitio de glicina del receptor de NMDA, los resultados sugieren que el bloqueo del sitio de glicina del receptor de NMDA por antagonistas de glicina representa un método novedoso de tratamiento del dolor crónico en un mamífero. Puesto que los antagonistas de glicina de la presente invención no tienen efectos secundarios (similares a PCP) de comportamiento adversos comunes a otros bloqueantes de receptores de NMDA, esta invención proporciona medicamentos novedosos y mejorados enormemente para tratar el dolor crónico en mamíferos incluyendo (y preferiblemente) seres humanos.

Ejemplo 73

La solubilidad de sales de colina en comparación con sales de potasio de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-dionas

La 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia) es insoluble en agua pero se disuelve en presencia de 4 equivalentes de KOH (o 5 equivalentes de NaOH). El pH de la disolución es de 12,7. Esta sal permanece soluble si el pH se disminuye hasta 11,9 mediante la adición de 1 equivalente de ácido acético. La adición adicional de 1 equivalente de ácido acético provoca que se forme un precipitado. A pH 11, la precipitación está esencialmente completa.

Observaciones espectroscópicas (300 MHz 1 RMN, FTIR) y determinaciones de punto de fusión sugieren que el precipitado por pH es la sal de mono-K o mono- Na^+ de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, lo que sugiere que las monosales son bastante insolubles en agua.

De manera inesperada, se descubrió que la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona puede disolverse fácilmente en 1 ó 2 equivalentes de hidróxido de colina. Cuando se disuelve la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en 1 equivalente de hidróxido de colina seguido de la adición de ácido acético, no se forma un precipitado hasta pH 9,4. Por tanto, la disolución de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en 1 equivalente de hidróxido de colina conduce a la sal de monocolina que, al contrario que las sales de sodio y potasio, es bastante soluble en agua. Véase la figura 21.

Se aisló la sal de monocolina liofilizando la disolución. Se obtuvo un polvo seco, ligeramente marrón. Puede añadirse agua para dar una disolución soluble de 90 mg/1 ml de agua. Se disolvió instantáneamente el polvo en el agua dando una disolución transparente, ligeramente marrón. Por tanto, puede aislarse la sal de monocolina de la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en forma pura.

ES 2 313 714 T3

En un segundo experimento, se determinó que la sal de monocolina de 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona también es altamente soluble en agua. Tras disolver este compuesto en 1 equivalente de hidróxido de colina, la adición de ácido acético no provoca que se produzca un precipitado hasta que el pH alcanza aproximadamente 8.

5 Por tanto, pueden prepararse sales de amonio altamente solubles en agua de dionas de quinoxalina. Puesto que la solubilidad en agua es un requisito previo para el uso terapéutico humano, este descubrimiento representa un avance significativo en la técnica.

10 Ejemplo 74

Formulación de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en Tris (trometamina)

Se preparó una disolución 5 mg/ml de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona disolviendo la 5-nitro-6,7-quinoxalin-2,3-diona en una disolución acuosa que contenía polietilenglicol 400 al 10% (PEG-400), Tween-80 al 0,45% y Tris (trometamina) 0,18 M dando una concentración final de 5 mg/ml de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se disolvió fácilmente la 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en esta formulación. Se esterilizó la disolución mediante autoclave y se encontró que era estable durante al menos dos meses. Se espera que esta disolución sea estable durante al menos 1-2 años. Se preparó una disolución de 10 mg/ml de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona disolviendo el compuesto en una disolución que contenía PEG-400 al 50%, Tween-80 al 0,5% y Tris (trometamina) 0,1 M. Se disolvió rápidamente la 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en esta disolución calentando hasta 60-100°C. Se trató mediante autoclave la disolución y se encontró que era estable durante al menos 2 meses. Se espera que esta disolución sea estable durante al menos 1-2 años. También se preparó una de disolución 5 mg/ml de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sin PEG-400 disolviendo el compuesto en una disolución que contenía Tris 0,05 M (trometamina), Tween-80 al 0,5% y glucosa al 5%. Se esterilizó la disolución y se encontró que era estable durante al menos dos meses. Se espera que esta disolución sea estable durante al menos 1-2 años.

30 Ejemplo 75

Formulación de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en bis-tris-propano (compuesto de referencia).

35 Se preparó una disolución 10 mg/ml de 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona disolviendo el compuesto en bis-tris-propano 0,1 M, PEG-400 o propilenglicol al 50%, Tween-80 al 0,75%. Se disolvió fácilmente el compuesto calentando en un baño de agua hirviendo. Se trató mediante autoclave la disolución y se encontró que era estable durante al menos 2 meses. Se espera que el compuesto en la disolución de bis-tris-propano sea estable durante al menos 1-2 años.

40

Ejemplo 76

45 *Actividad sedante/hipnótica de los compuestos de referencia 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en la prueba de reflejo de enderezamiento en el ratón*

Cuando los ratones se tumban sobre su lomo, se enderezan de nuevo por sí mismos sobre sus pies inmediatamente. Fármacos sedantes hipnóticos o fármacos anestésicos, a dosis bajas, provocarán un retraso en el reflejo de enderezamiento o, a dosis superiores, provocarán que el animal permanezca sobre su lomo durante un periodo de tiempo prolongado. Se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto de la 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y su análogo 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona sobre el reflejo de enderezamiento en ratones tras la inyección intraperitoneal. Se compararon las dos quinoxalindionas con ketamina, un bloqueante de canal de NMDA conocido con actividad anestésica.

55 Se inyectaron ratones macho Swiss/Webster (25-30 g) por vía intraperitoneal con 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona o 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en DMSO (1 μ l/g), ambas a una dosis de 50 mg/kg o con 50 mg/kg de ketamina en solución salina (1 μ l/g). Se sometió a prueba el reflejo de enderezamiento tumbando los animales sobre su lomo a intervalos de 5 minutos. Se puntuó el efecto de los fármacos sobre el reflejo de enderezamiento tal como sigue: se puntuaron los animales que se enderezaron por sí mismos inmediatamente tras tumbarse con 0; se puntuaron los animales que se enderezaron por sí mismos entre 1 y 2 segundos con 1; se puntuaron los animales que se enderezaron por sí mismos a entre 2 y 10 segundos con 2; y se puntuaron los animales que no se enderezaron por sí mismos tras 10 segundos con 3. Se sometieron a prueba trece animales en el grupo de la 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, se sometieron a prueba 10 animales en el grupo de la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y se sometieron a prueba 10 animales en el grupo de la ketamina.

65

La figura 22A muestra los efectos de los tres fármacos sobre el reflejo de enderezamiento. La 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona cincuenta mg/kg mostró una inhibición fuerte y duradera del reflejo de enderezamiento. Por el contrario, la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona era completamente inactiva a la misma dosis (50

mg/kg). La ketamina, a 50 mg/kg mostró una inhibición de actuación corta del reflejo de enderezamiento que duraba aproximadamente 15 minutos. La ketamina no alcanzó el grado de inhibición del reflejo de enderezamiento observado con 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Por tanto, el antagonista de glicina/NMDA 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es un compuesto sedante/hipnótico y anestésico con una fuerza considerablemente superior a la ketamina, un agente anestésico usado clínicamente. Puesto que la ketamina actúa en el sitio de PCP del receptor de NMDA, tiene efectos secundarios de comportamiento similares a PCP. La 5,7-Dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es un antagonista de glicina y por tanto no tiene efectos secundarios similares a PCP.

Puesto que las afinidades de unión de 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona a receptores de glicina, cainato y AMPA no son sustancialmente diferentes entre los dos compuestos, se concluye que la diferencia entre los compuestos en lo que respecta a su efecto sedante/hipnótico se debe al hecho de que la 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona puede penetrar la barrera sangre/cerebro mientras que la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no. Estos hallazgos extienden las observaciones previas de que la 5,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es altamente activa a la hora de evitar convulsiones inducidas por sonido en ratones DBA-2, mientras que la 6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona es completamente inactiva.

Se concluye que una sustitución en la posición 5 en el sistema de anillo de quinoxalindiona es crucial para lograr la actividad *in vivo* tras la administración sistémica incluyendo la actividad sedante/hipnótica y anticonvulsivo. La presente invención se refiere a este descubrimiento.

Ejemplo 77

Discriminación de PCP en ratas con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (compuesto de referencia) y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona

La fenciclidina (PCP) es una droga importante y produce una intoxicación alarmante incluso si se toma a dosis subanestésicas (Balster, R.L., "The behavioral pharmacology of phencyclidine", en *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, Meltzer, H.Y., ed., Raven Press, Nueva York, págs. 1573-1579 (1987)). Se ha desarrollado un modelo animal que es predictivo de la capacidad de los fármacos para producir una intoxicación similar a PCP en seres humanos. El modelo utiliza procedimientos de entrenamiento de discriminación de fármacos para enseñar a los animales a percibir la intoxicación por PCP. Cada día, las ratas que se habían entrenado para presionar la palanca para un refuerzo de alimento deben seleccionar cuál de las dos palancas en sus jaulas es correcta. El único estímulo que tienen para seleccionar la palanca correcta es su capacidad para detectar si reciben una inyección de PCP o de vehículo. Tras aproximadamente dos meses de entrenamiento, las ratas llegan a ser muy buenas en discriminar las inyecciones de PCP de las de vehículo y entonces pueden someterse a prueba con otros fármacos para determinar si éstos se discriminan como la PCP.

Cuando se someten a prueba en este procedimiento, otros fármacos que se sabe que producen una intoxicación similar a PCP sustituyen a la PCP. Estos fármacos incluyen diversos análogos de PCP tales como ketamina, el fármaco sigma agonista N-alilnormetazocina y los dioxolanos 1,3-sustituidos, dexoxadrol y etoxadrol (Brady *et al.*, *Pharm. Biochem. Behav.* 17:291-295 (1982); Brady *et al.*, *Science* 212:178-180 (1982); Brady *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.* 220:56-62 (1982); Slifer y Balster, *Subst. Alcohol Actions/Misuse* 5:273-280 (1984); Balster y Willetts, "Receptor mediation of the discriminative stimulus properties of phencyclidine and sigma-opioid agonists", en *Transduction Mechanisms of Drug Stimuli*, Colpaert y Balster, eds., Springer-Verlag, Berlín, págs. 122-135 (1988)).

Para este estudio, se sometieron a prueba ratas entrenadas para discriminar PCP 2 mg/kg del vehículo de solución salina con 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona. Se seleccionó cuidadosamente el intervalo de dosis de cada compuesto para asegurar que una dosis suficientemente alta produce efectos sobre el cerebro y se sometió a prueba el comportamiento.

Métodos

Los sujetos eran seis ratas macho adultas Sprague-Dawley (COBS CD, Charles River Farms, Wilmington, DE), alojadas individualmente, y mantenidas en un régimen de alimentación restringido.

Aparato. Se llevaron a cabo sesiones experimentales en cámaras operantes de rata de 2 palancas, comerciales que contenían cubículos que atenuaban la luz y el sonido. Se equiparon las cámaras con dispensadores de gránulos para gránulos de 45-mg. Una luz de estímulo señalaba si las sesiones habían comenzado.

Entrenamiento. Antes de comenzar este estudio, se habían entrenado las ratas para presionar la palanca para un refuerzo de alimento bajo un programa de razón fija 32 durante sesiones de 30 min. diariamente (lunes-viernes). En las sesiones de entrenamiento, se reforzó la respuesta sólo a una de las palancas; las respuestas en la palanca incorrecta reiniciaban el requerimiento de razón fija en la palanca correcta. Durante el entrenamiento, se asoció cada palanca con una inyección de o bien PCP 2 mg/kg o bien de solución salina. Se produjeron las sesiones de entrenamiento de PCP y de solución salina en una secuencia de alternancia doble. Se continuó el entrenamiento hasta que los sujetos comenzaron cada sesión en la palanca correcta durante cuatro sesiones consecutivas. Tras completar el entrenamiento (2-3 meses), se comenzó la fase de prueba.

ES 2 313 714 T3

Pruebas. Se llevaron a cabo pruebas de generalización dos veces por semana (jueves y viernes). Entre sesiones de prueba, se proporcionó a los animales entrenamiento continuado con inyecciones de PCP y de solución salina. Se llevaron a cabo las pruebas si en la sesión de entrenamiento anterior, la primera razón fija era en la palanca correcta y en global había una respuesta de palanca correcta superior al 85%. En las sesiones de prueba, se reforzó la respuesta a ambas palancas. Se llevaron a cabo pruebas con PCP 2,0 mg/kg y solución salina al comienzo de cada determinación de curva dosis-efecto. Se llevaron a cabo pruebas con PCP (0,5, 1,0, 2,0, 4,0 y 8,0 mg/kg), 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (6,0, 12,5 y 25 mg/kg) y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 16,0 mg/kg). También se llevaron a cabo pruebas con el vehículo de DMSO 0,5 ml/kg antes de someter a prueba 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona.

Fármacos. Se obtuvo fenciclidina HCl del National Institute on Drug Abuse. Se disolvió en solución salina y se administró en 1,0 ml/kg i.p. 15 min. antes del entrenamiento y de las sesiones de pruebas. Las dosis se refieren a la sal de HCl. Se disolvieron 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en DMSO de modo que el volumen de inyección para todas las dosis era de 0,5 ml/kg. Se inyectaron i.p. tanto 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona como 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona 40 min. antes de las sesiones de prueba.

Análisis de datos. El grado de similitud de fármaco de prueba con PCP 2,0 mg/kg se refleja en el porcentaje medio de respuestas en la palanca de PCP. Se revelaron efectos no específicos en el comportamiento en diferencias en las tasas medias de respuesta a partir de pruebas control de solución salina. Cuando las tasas de respuesta durante la pruebas con dosis de fármaco altas disminuían hasta menos de 0,05/segundo, la respuesta de palanca de PCP en porcentaje para ese sujeto para esa prueba no se incluyó en la media del grupo. Esto se realizó ya que es difícil interpretar los datos de selección de palanca si los sujetos están gravemente perjudicados.

Resultados

Los resultados tanto para 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona como para 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona se muestran en las figuras 23A y 23B. En las partes izquierdas de las figuras están los resultados de pruebas de control con solución salina 1,0 ml/kg, PCP 2 mg/kg y DMSO 0,5 ml/kg. Tanto la solución salina como el DMSO produjeron una respuesta de palanca de PCP del 0% en cada ocasión en la que se sometieron a prueba (panel superior). La PCP, cuando se sometió a prueba cada una de las determinaciones de curva dosis-respuesta, proporcionó una respuesta de palanca de PCP del 100%. Esta precisión consistente es típica de este procedimiento de discriminación. Las tasas de respuesta tras solución salina, PCP y DMSO (panel inferior) eran de algún modo más variables, pero no había un efecto claro de que o bien PCP o bien DMSO produjeran tasas de respuesta diferentes a las de las pruebas de control de solución salina.

Cuando se sometieron a prueba dosis diferentes de PCP, se produjo un aumento relacionado con la dosis en la respuesta de palanca de PCP. A 2 mg/kg y superior, se produjo una generalización del 100%. Sólo la dosis de 8 mg/kg de PCP redujo las tasas de respuesta, mostrando la especificidad de este procedimiento para efectos de estímulo discriminatorio similares a PCP de dosis baja.

Ni 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona ni 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona produjeron ninguna respuesta de palanca de PCP a ninguna dosis sometida a prueba. La 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona produjo efectos de disminución de tasa de respuesta relacionada con la dosis a 12,5 y 25 mg/kg. La 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona produjo efectos de disminución de tasa de respuesta a dosis de 6, 8 y 16 mg/kg. Considerando la variabilidad en estos datos, no puede concluirse que la 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona fuera de manera fiable más potente que la 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona para los efectos de tasa de respuesta. Sin embargo, está claro que se evaluó un intervalo de dosificación activa para el comportamiento de ambos compuestos.

Discusión y conclusiones

Tanto 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona como 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona carecían completamente de efectos de estímulo discriminatorios similares a PCP. A este respecto se diferencian radicalmente de los antagonistas de NMDA no competitivos de sitios PCP tales como PCP, dizocilpina, ketamina y (+)-N-alilnormetazocina, que se sustituyen completamente por PCP en este procedimiento (Brady *et al.*, Pharm. Biochem. Behav. 17:291-295 (1982); Brady *et al.*, Science 212:178-180 (1982); Willetts y Balster, Eur. J. Pharm. 146:167-169 (1988)). La capacidad de los compuestos de prueba para producir efectos similares a PCP en ratas es predictiva de su capacidad para producir efectos psicotomiméticos similares a PCP y responsabilidad de abuso en seres humanos. Por tanto, estos datos soportarían la conclusión de que 5-cloro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona carecen de estos efectos secundarios similares a PCP. Por otro lado, no puede concluirse a partir de estos datos que estos compuestos puedan carecer de otros efectos secundarios, sólo que no se esperaba que fueran muy similares a los producidos por PCP.

Ejemplo 78

Ausencia de estimulación motriz similar a PCP mediante 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona en ratones

5

Introducción

Antagonistas de receptor de NMDA, en particular los bloqueantes de canal de NMDA, provocan una estimulación del comportamiento en roedores (Koek *et al.*, J. Pharmacol. Exptl. Ther. 245:969 (1988)). Se cree que la estimulación del comportamiento subyace a los efectos secundarios psicotomiméticos de PCP en hombres (Koek *et al.*, J. Pharmacol. Exptl. Ther. 245:969 (1988); Tricklebank *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 167:127-135 (1989)). La estimulación del comportamiento es particularmente pronunciada con bloqueantes de canal de NMDA tales como MK801 y PCP pero también está provocada por antagonistas de NMDA competitivos tales como CGS19755 (Tricklebank *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 167:127-135 (1989)).

15

Con el fin de someter a prueba si la 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona tiene efectos estimulantes sobre el comportamiento en roedores, se sometió a prueba el compuesto en una prueba de actividad locomotriz. Se encontró que la 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, a dosis de hasta niveles anestésicos, no inducía estimulación del comportamiento tal como se evalúa por la actividad locomotriz. Por el contrario, MK081, a dosis sub-anestésicas, provocó una estimulación fuerte del comportamiento locomotor. Estos resultados sugieren que la 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona puede que no tenga efectos estimulantes del comportamiento similares a PCP.

20

Métodos y materiales

25

Se obtuvieron ratones macho Swiss/Webster (25-30 g) de Simonsen y se alojaron en grupos de 8-10 en una habitación con temperatura controlada y un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Se proporcionó alimento y agua a voluntad.

30

Se sometió a prueba la actividad locomotriz usando un aparato de actividad locomotriz Omnitech. Se inyectaron los animales por vía intraperitoneal (i.p.) con o bien DMSO o bien 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona disuelta en DMSO a dosis de 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 5 mg/kg. El volumen de inyección era de 1 ml/kg. Entonces se colocaron los animales en la cámara de actividad locomotriz y se registró su comportamiento locomotor durante 4 intervalos sucesivos de 15 minutos. Se inyectaron otros animales (i.p.) con o bien solución salina o bien MK801 en solución salina a dosis de 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 5 mg/kg seguido del registro de la actividad locomotriz.

35

Resultados

La inyección de MK801 (i.p.) en ratones Swiss/Webster produjo un aumento dependiente de la dosis en la actividad locomotriz (figura 24). Se registró el nivel más alto de actividad locomotriz en el segundo intervalo de quince minutos. Por tanto, la actividad locomotriz en el segundo intervalo de quince minutos tras la inyección de fármaco se muestra en la figura 24. El pico de actividad locomotriz se produjo mediante una dosis de 0,25 mg/kg de MK801. El aumento adicional de la dosis de MK801 dio como resultado una actividad locomotriz inferior en relación con la dosis de 0,25 mg/kg. Una dosis de 5 mg/kg de MK801 dio como resultado la supresión de la actividad locomotriz por debajo de los niveles iniciales. Por el contrario, la 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no provocó ninguna estimulación de la actividad locomotriz por encima de los niveles iniciales (figura 24). Una dosis de 5 mg/kg de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona redujo la actividad locomotriz por debajo de los niveles iniciales. También se sometieron a prueba dosis superiores de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona (10, 20 y 50 mg/kg). Con ninguna dosis hubo una estimulación de la actividad locomotriz. A la dosis de 50 mg/kg, los animales tenían una completa pérdida del reflejo de enderezamiento 30 minutos tras la inyección i.p. También hubo una pérdida notable de respuesta al dolor lo que sugiere una actividad anestésica de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona a la dosis de 50 mg/kg.

55

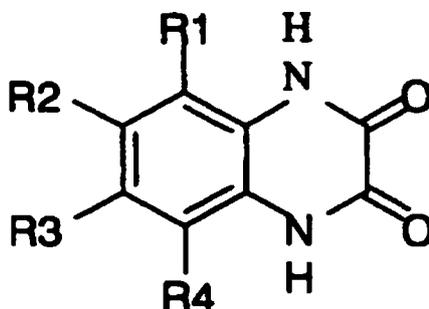
Conclusión

La 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no produjo estimulación de la actividad locomotriz en ratones. Por el contrario, el bloqueante de canal de NMDA MK-801 produjo una fuerte estimulación de actividad locomotriz consistente con los efectos de comportamiento similares a PCP provocados por este compuesto. La ausencia de efectos estimulantes de comportamiento similares a PCP sugiere que el antagonista de NMDA/glicina 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona no tiene los efectos estimulantes de comportamiento adversos que han plagado el desarrollo clínico de otras clases de antagonistas de NMDA.

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición farmacéutica que comprende un compuesto que tiene la fórmula



o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en la que R¹ es flúor, bromo, yodo, amino, hidroxilamino, un grupo amino sustituido con un grupo acilo C₂₋₆, (por ejemplo grupos acetilo, propionilo, butanoílo, pentanoílo y hexanoílo), un grupo alquilo C₁₋₆ sustituido con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo, o nitro;

R² es amino, hidroxilamino, un grupo amino sustituido con un grupo acilo C₂₋₆, (por ejemplo grupos acetilo, propionilo, butanoílo, pentanoílo y hexanoílo), nitro, alquilo C₁₋₆ alquilo sustituido con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo, o halógeno;

R³ es halógeno, amino, hidroxilamino, un grupo amino sustituido con un grupo acilo C₂₋₆, (por ejemplo grupos acetilo, propionilo, butanoílo, pentanoílo y hexanoílo) o un alquilo C₁₋₆ sustituido con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo; y

R⁴ es hidrógeno;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable,

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de:

(a) pérdida neuronal asociada a accidente cerebrovascular, isquemia, traumatismo del SNC, hipoglucemia o cirugía;

(b) una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y síndrome de Down;

(c) dolor crónico;

(d) ansiedad;

(e) convulsiones; o

(f) psicosis.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha pérdida neuronal se produce como resultado de:

(a) burbujas de aire que se depositan en el cerebro durante o inmediatamente tras la cirugía;

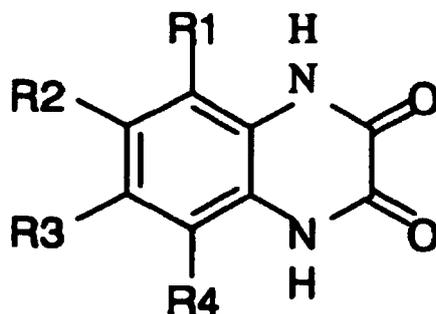
(b) cirugía de derivación cardiopulmonar;

(c) cirugía de endoarterioctomía carotídea; o

(d) accidentes cerebrovasculares múltiples que dan como resultado demencia.

ES 2 313 714 T3

3. Uso de una composición farmacéutica que comprende un compuesto que tiene la fórmula



o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en la que R¹ es flúor, bromo, yodo, amino, hidroxilamino, un grupo amino sustituido con un grupo acilo C₂₋₆, (por ejemplo grupos acetilo, propionilo, butanoílo, pentanoílo y hexanoílo), un grupo alquilo C₁₋₆ sustituido con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo, o nitro;

R² es amino, hidroxilamino, un grupo amino sustituido con un grupo acilo C₂₋₆, (por ejemplo grupos acetilo, propionilo, butanoílo, pentanoílo y hexanoílo), nitro, alquilo C₁₋₆ sustituido con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo, o halógeno;

R³ es halógeno, amino, hidroxilamino, un grupo amino sustituido con un grupo acilo C₂₋₆ (por ejemplo grupos acetilo, propionilo, butanoílo, pentanoílo y hexanoílo) o un alquilo C₁₋₆ sustituido con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo; y

R⁴ es hidrógeno;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable,

para la fabricación de un medicamento para:

(a) inducir anestesia; o

(b) inducir un efecto hipnótico.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicha composición un compuesto, en el que R¹ es flúor, bromo, yodo o nitro, R² es halógeno y R³ es halógeno o alquilo C₁₋₆ sustituido con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicha composición un compuesto en el que al menos uno de R¹-R³ es amino o acilamino C₂₋₆.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicha composición un compuesto que se selecciona de 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 6,7-difluoro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 6-cloro-5-nitro-7-bromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 6-cloro-5-nitro-7-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 5-bromo-6,7-difluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 5-amino-6,7-dibromo-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 5-amino-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 7-cloro-6-nitro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 6-amino-7-cloro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 7-bromo-6-nitro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 6-amino-7-bromo-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 7-fluoro-6-nitro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 6-amino-7-fluoro-5-trifluorometil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, 6,7-dicloro-5-hidroxilamino-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona y 6,7-dibromo-5-hidroxilamino-1,4-dihidroquinoxalin-2,3,-diona, o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicha composición un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en: 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 7-bromo-6-cloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, 6-cloro-7-trifluorometil-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona y 5-bromo-6,7-difluoro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Uso según la reivindicación 7, comprendiendo dicha composición 6,7-dicloro-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ES 2 313 714 T3

9. Uso según la reivindicación 7, comprendiendo dicha composición 6,7-dibromo-5-nitro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona, o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, comprendiendo dicha composición una sal de amonio de un compuesto de 1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona tal como se define en dicha reivindicación.

10 11. Uso según la reivindicación 10, comprendiendo dicha composición una sal de amonio, que es la sal de un compuesto de amino seleccionado del grupo que consiste en: tetraalquil-C₁₋₆-amina, una tri-alquil C₁₋₆-alcanolamina C₁₋₆, una aralquil C₆₋₁₂-trialquil C₁₋₆-amina, etilendiamina, dietilentriamina, N-metiletanolamina, di-(2-etanol)amina, tri-(2-etanolamina), espermidina, espermina, un aminocarbhidrato, N-metilglucamina, arginina, una N-alquil C₁₋₆-guanidina, una N,N-di-alquil C₁₋₆-guanidina, una N,N'-di-alquil C₁₋₆-guanidina, una N,N,N'-tri-alquil C₁₋₆-guanidina, una N,N,N',N'-tetra-alquil C₁₋₆-guanidina, biguanidina, N-alquil C₁₋₆-biguanidina, una N,N-dialquil C₁₋₆-biguanidina, una N,N'-dialquil C₁₋₆-biguanidina, amidina, una N-alquil C₁₋₄-amidina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno y Tris.

15 12. Uso según la reivindicación 10, comprendiendo dicha composición una sal de amonio, que es una de una sal de colina, una sal de tris; una sal de bis-tris-propano, una sal de N-metilglucamina o una sal de arginina.

20 13. Uso según la reivindicación 12, comprendiendo dicha composición la sal de tris de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona.

14. Uso según la reivindicación 12, comprendiendo dicha composición la sal de N-metilglucamina de 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona.

25 15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que dicha composición está adaptada para administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica o bucal.

30

35

40

45

50

55

60

65

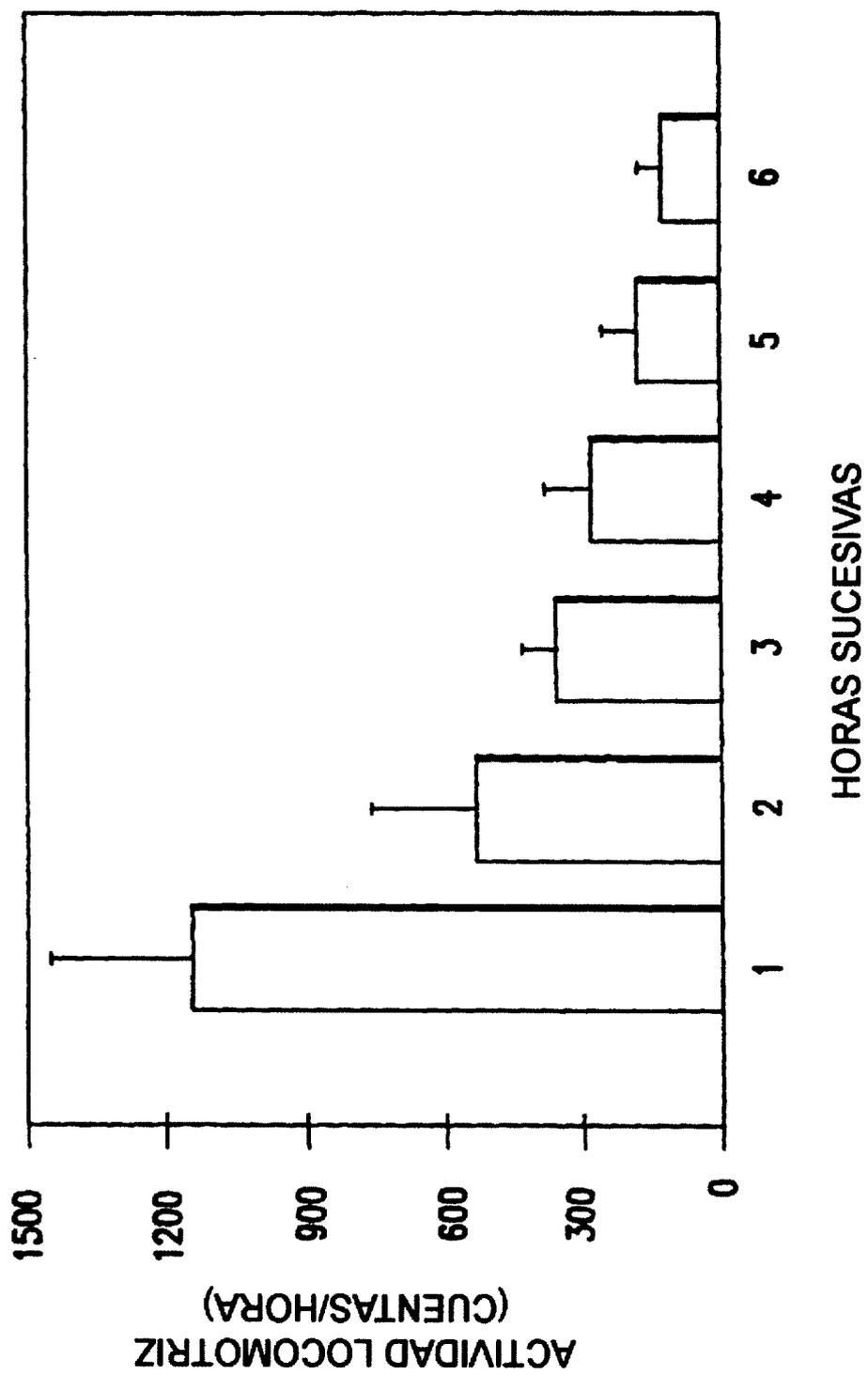


FIG.1

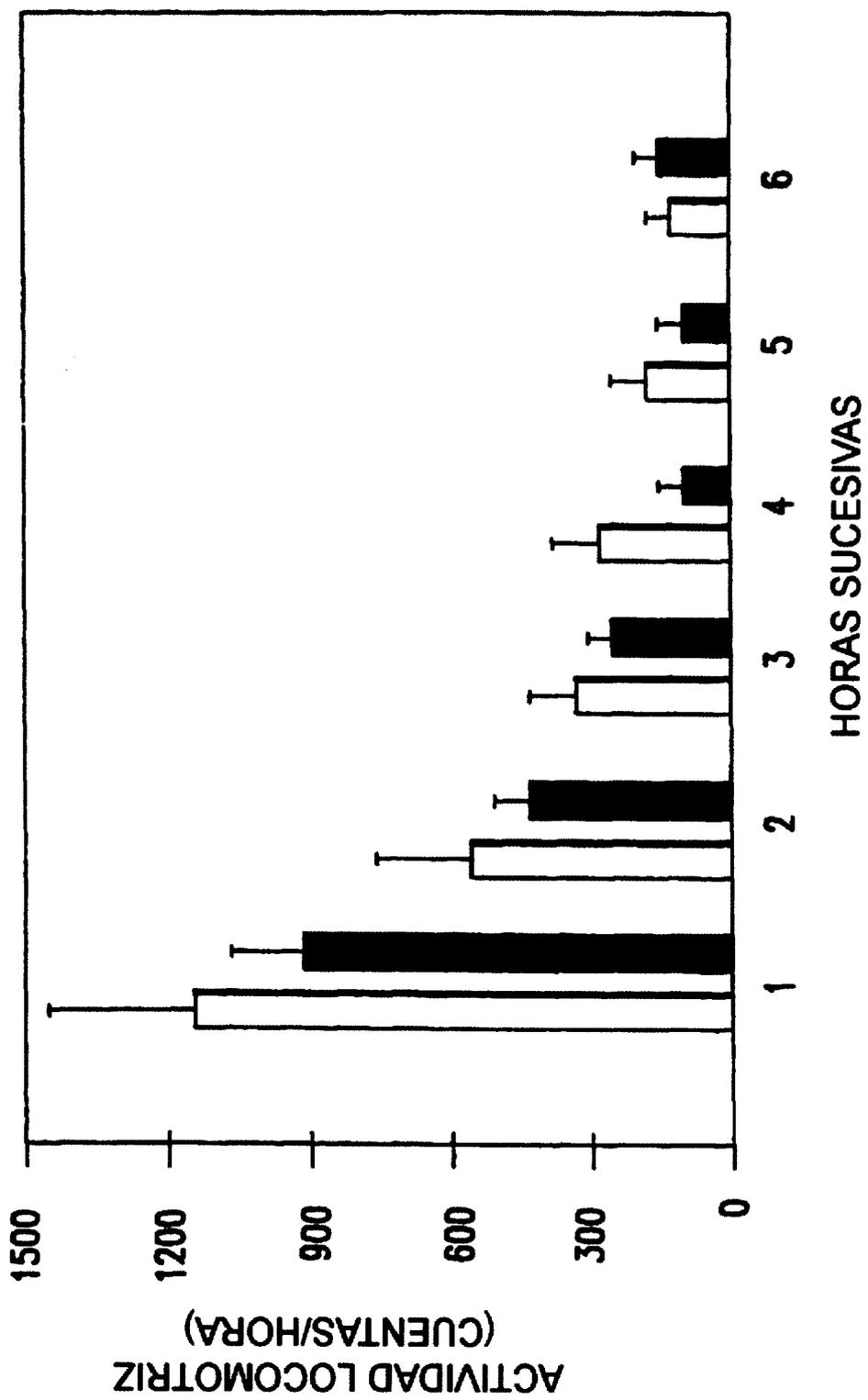


FIG.2

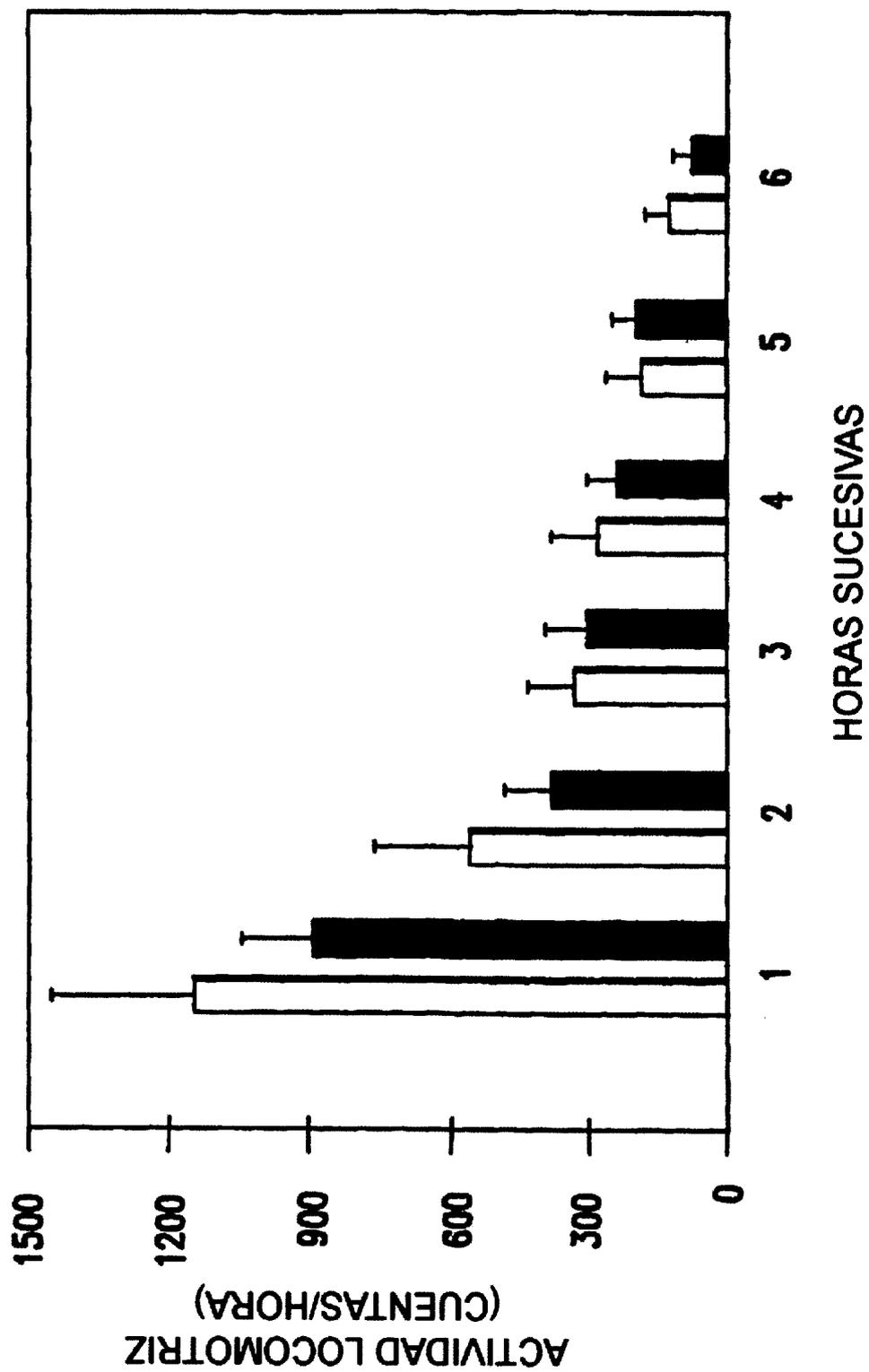


FIG.3

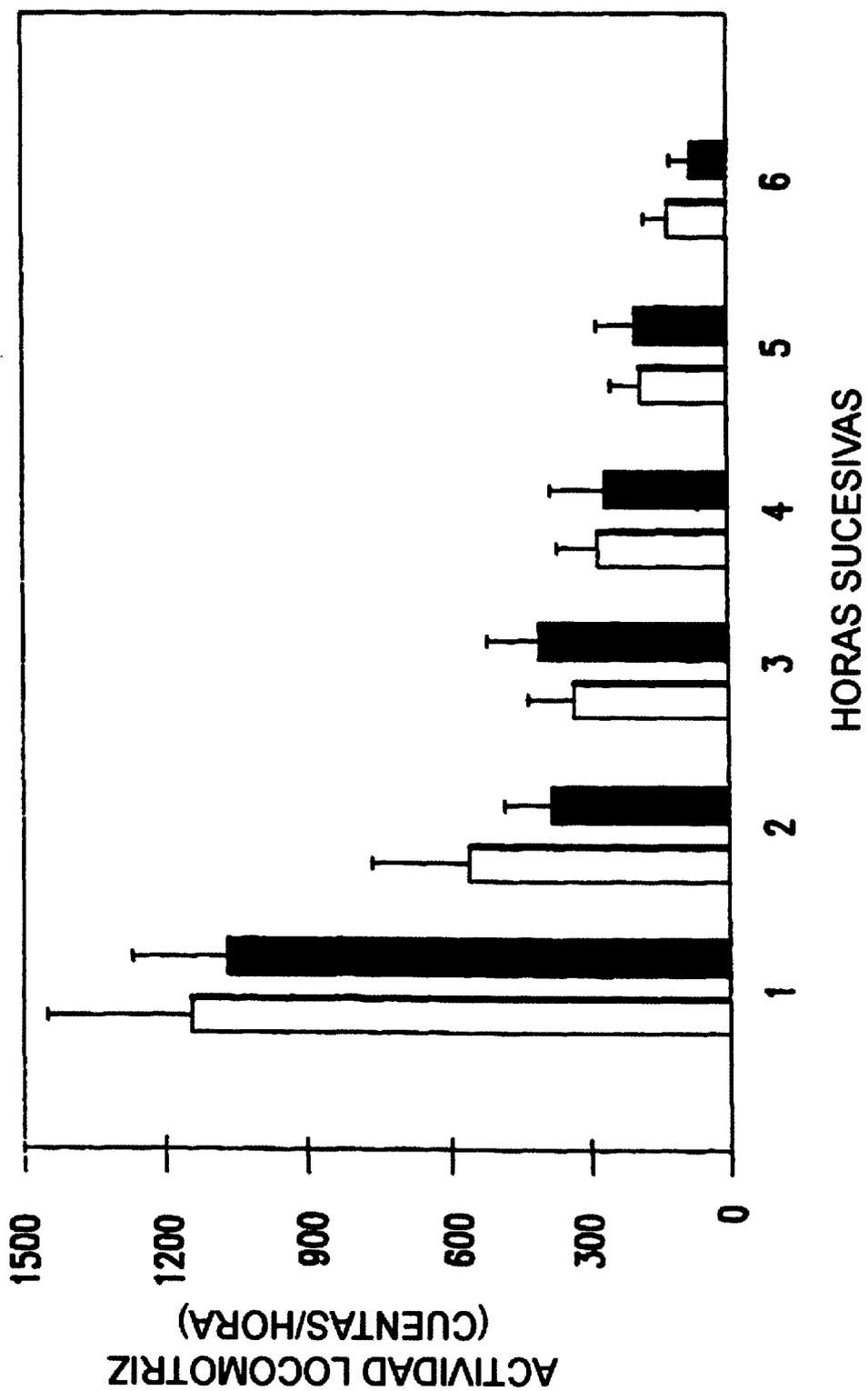


FIG.4

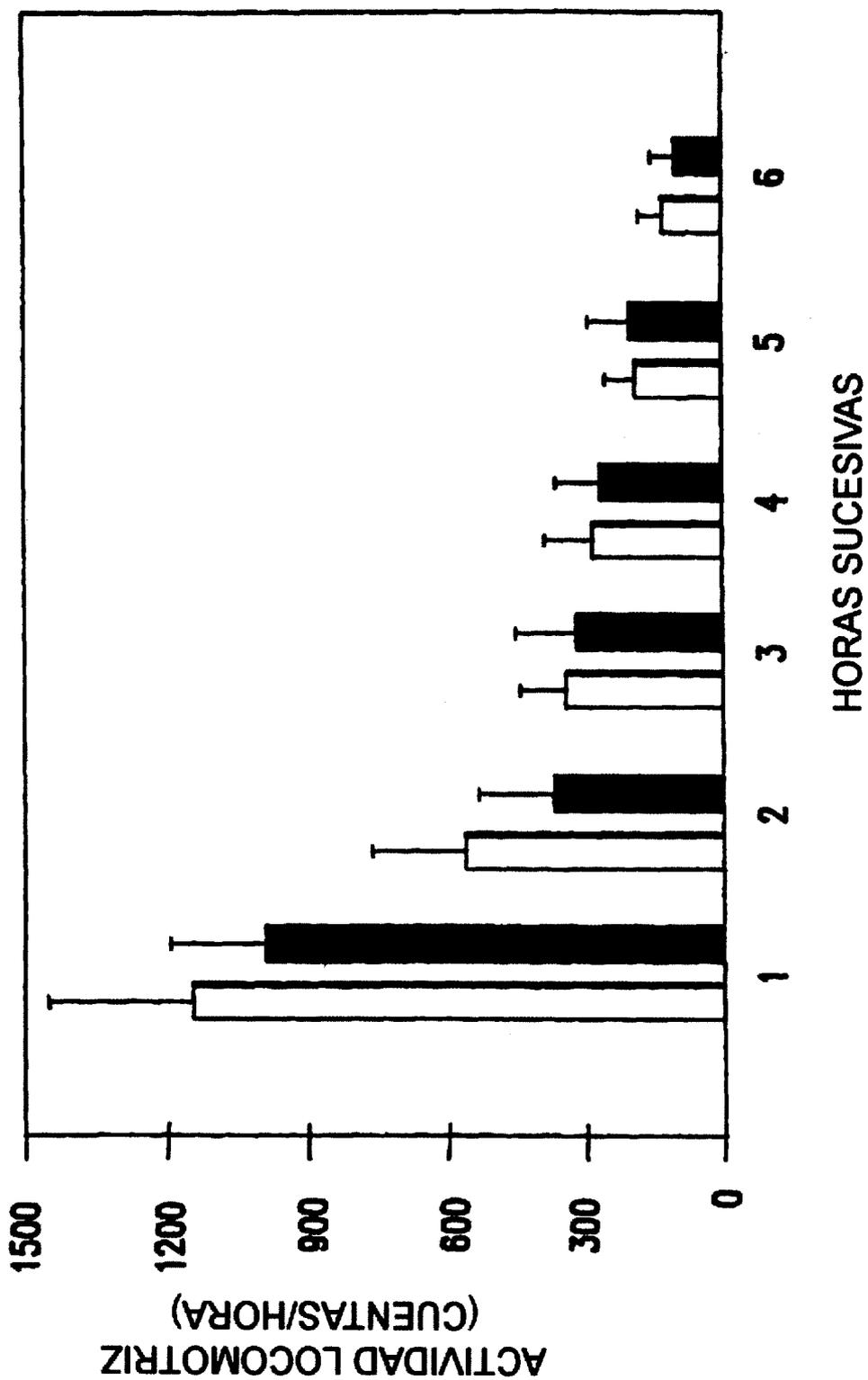


FIG.5

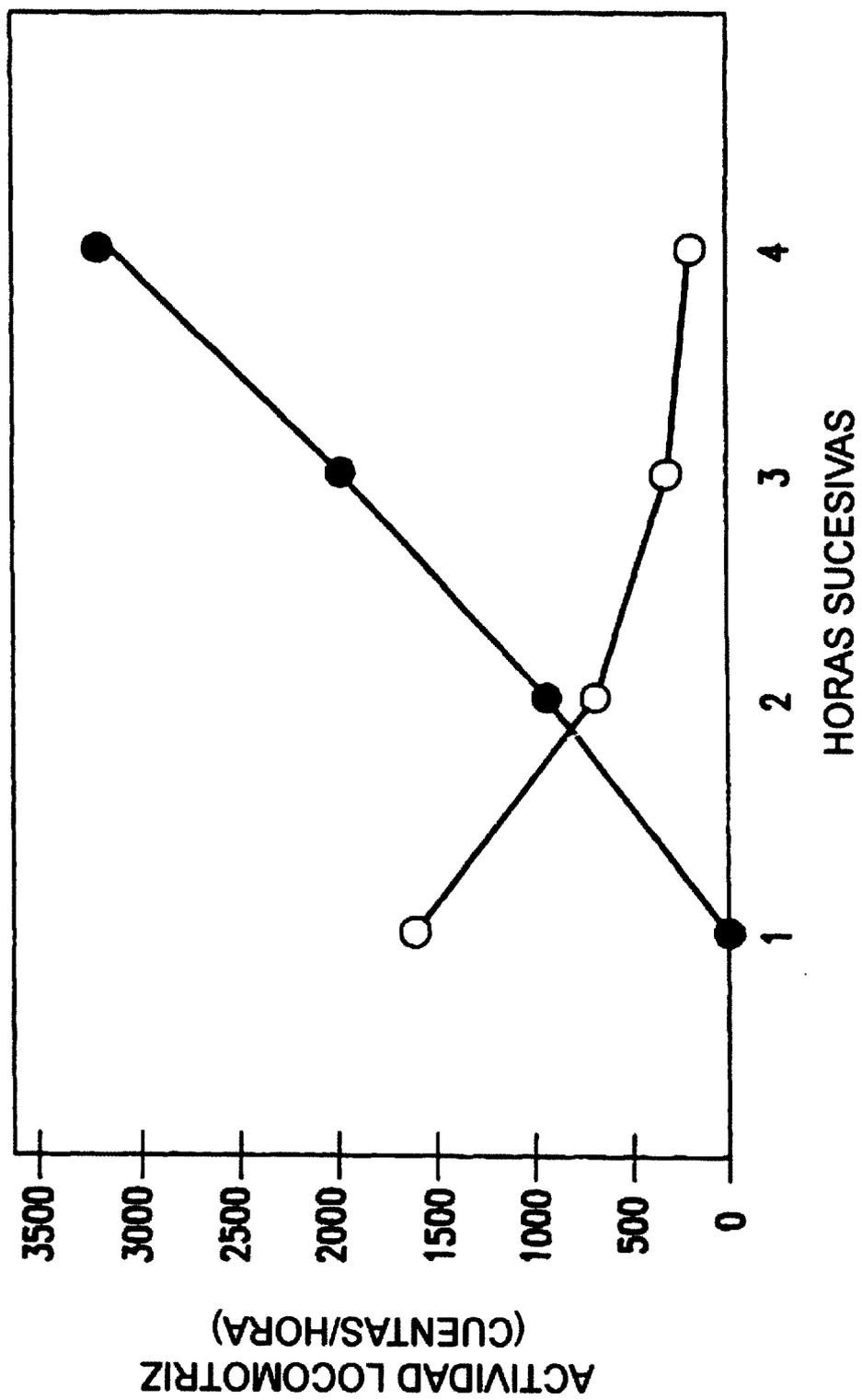


FIG.6

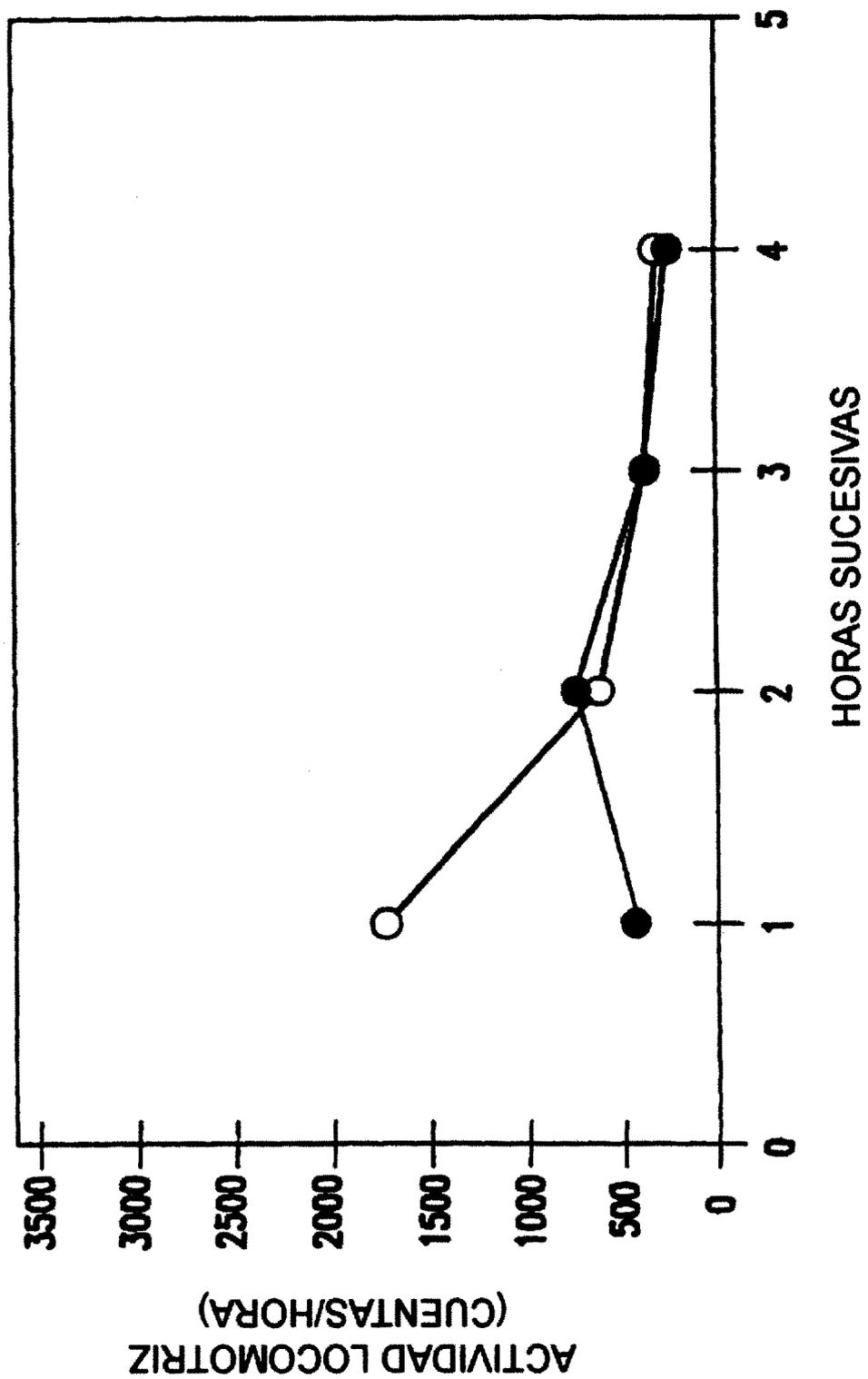


FIG.7

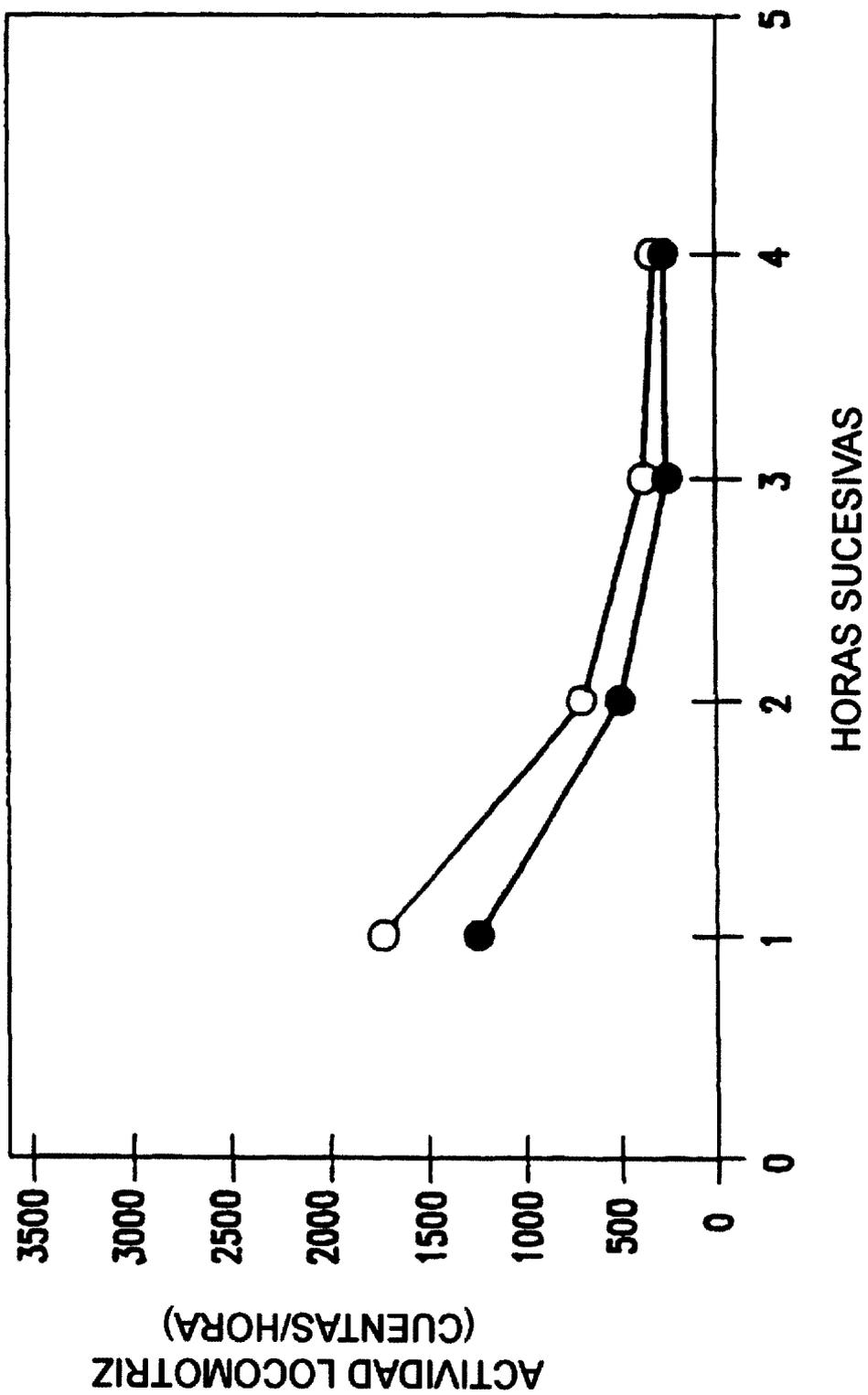


FIG.8

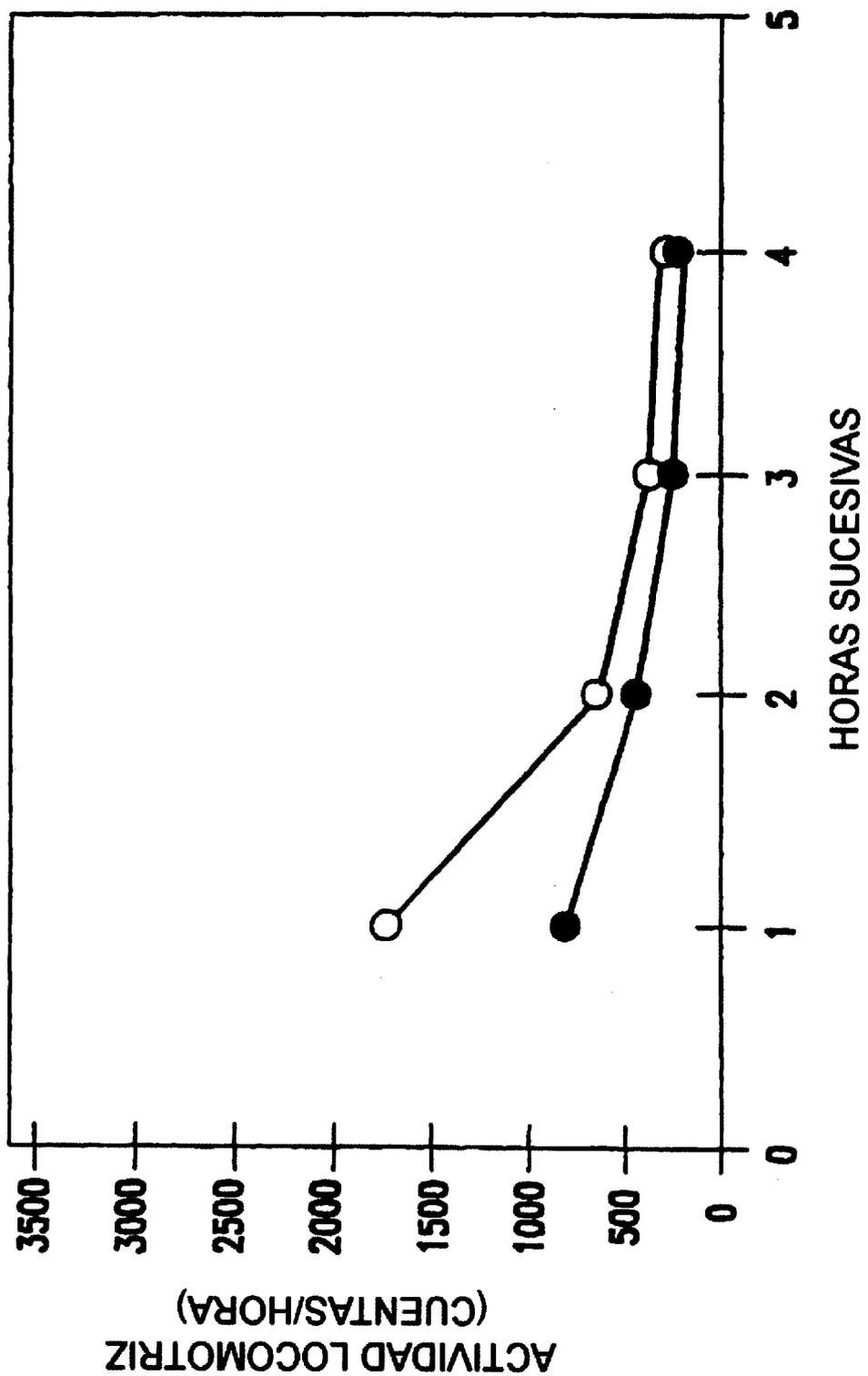


FIG.9

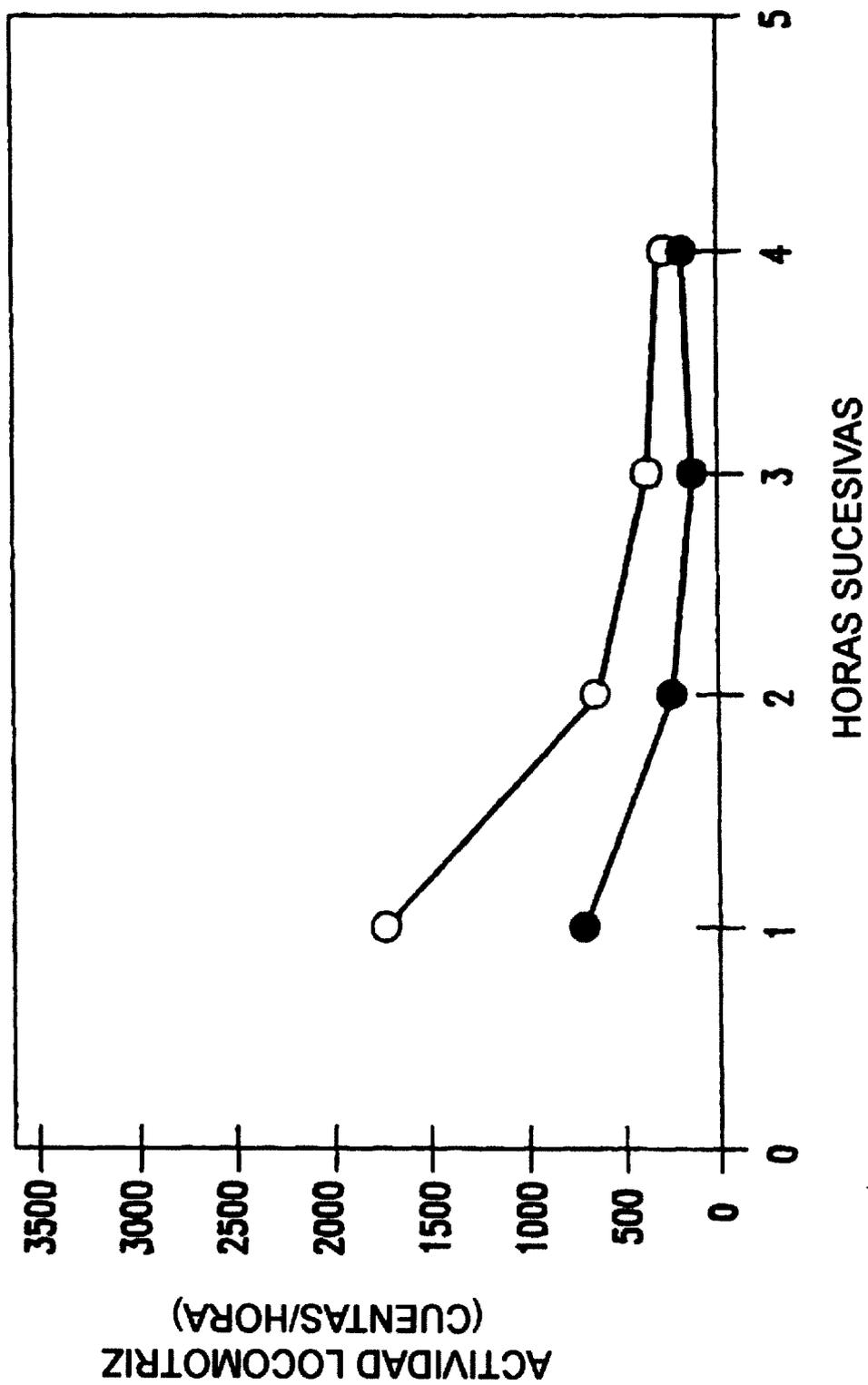


FIG.10

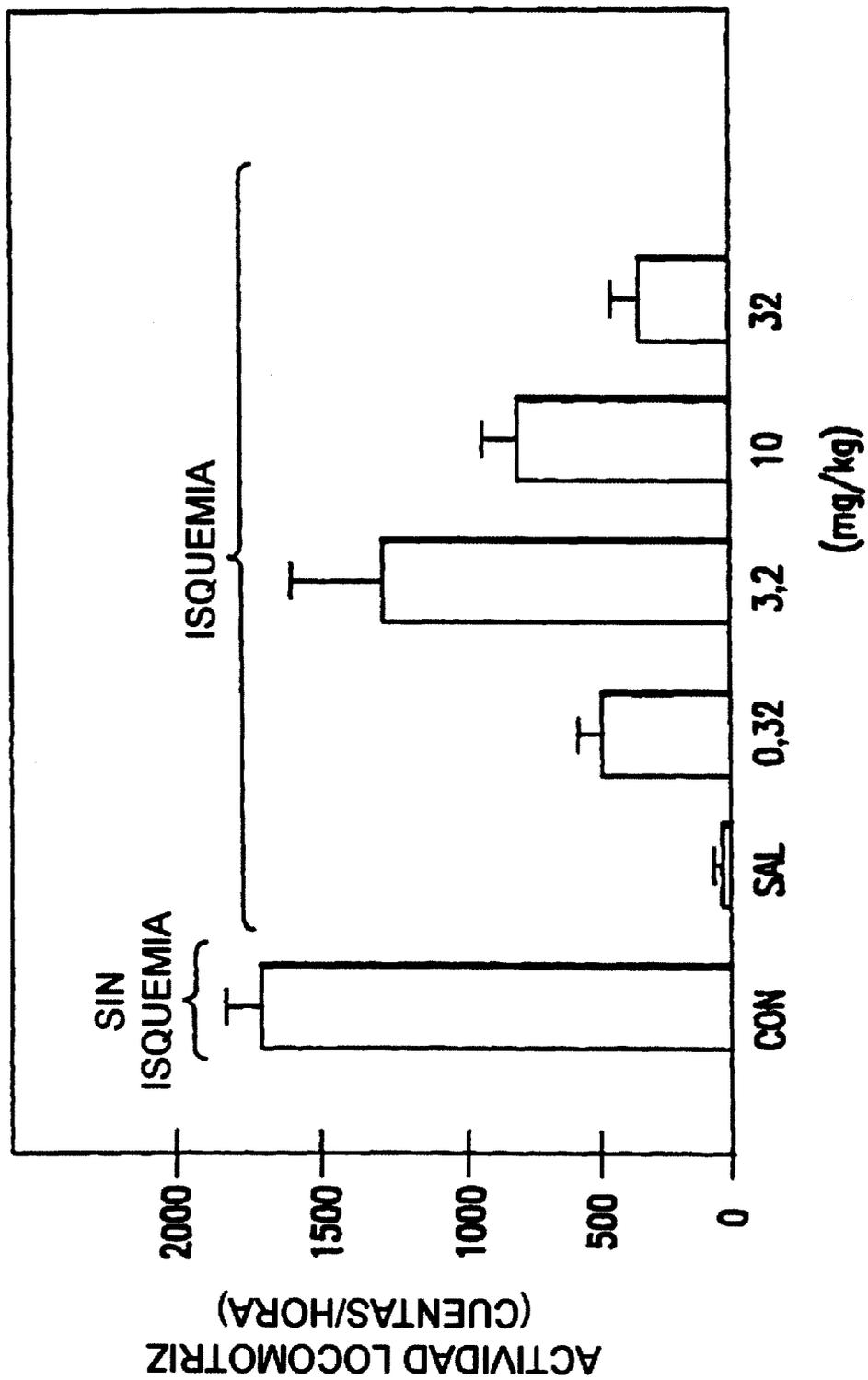


FIG.11

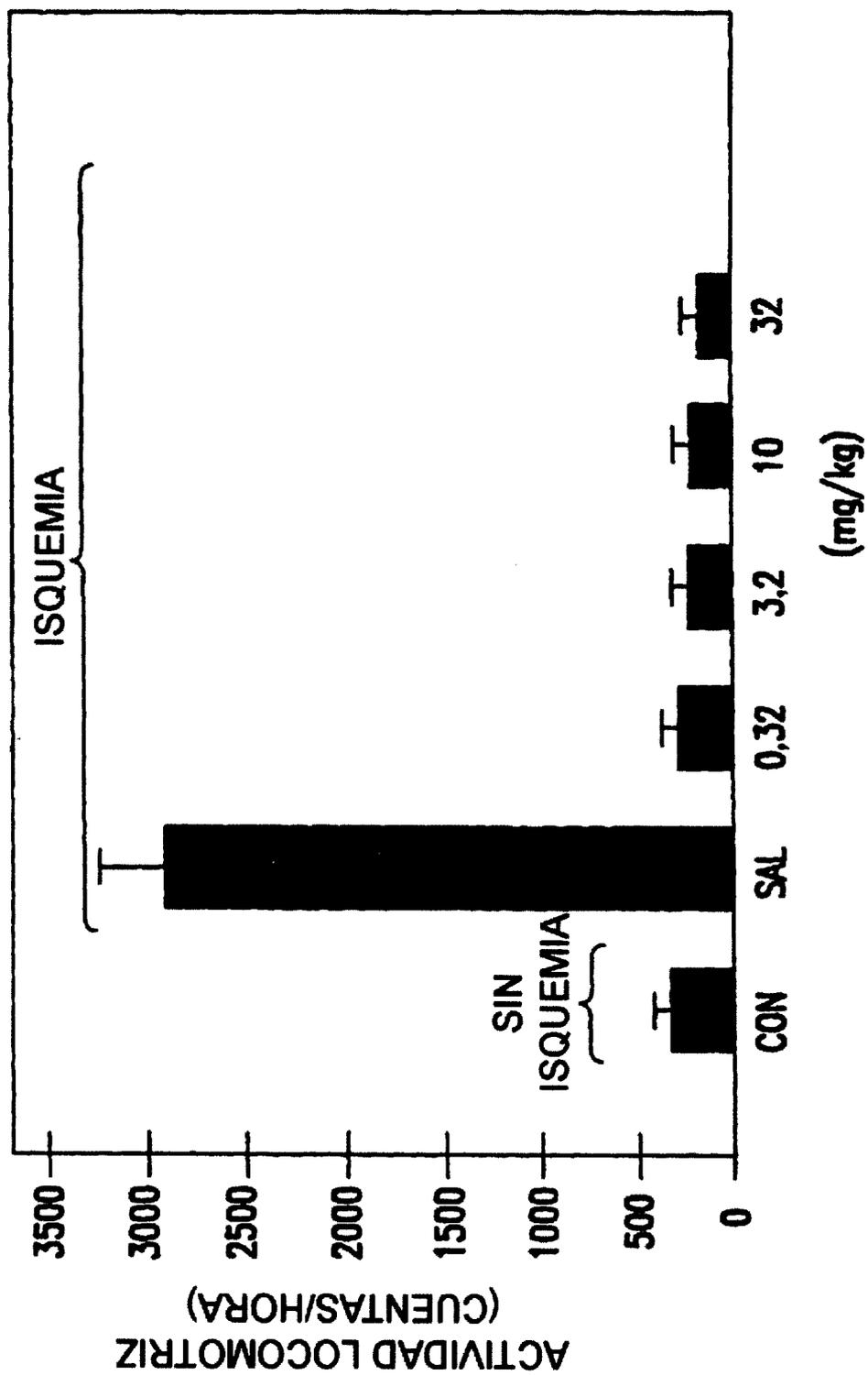


FIG.12

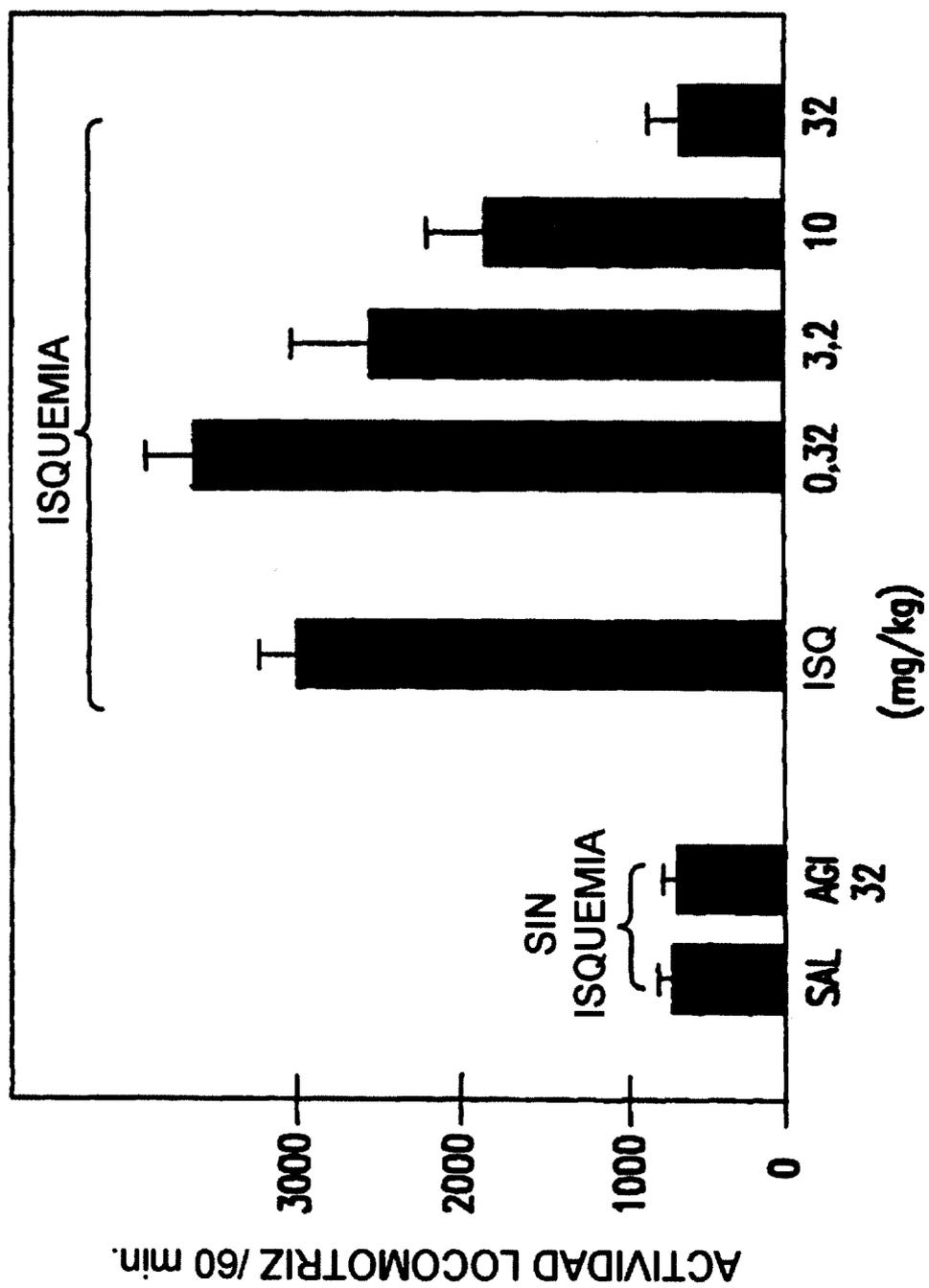


FIG.13

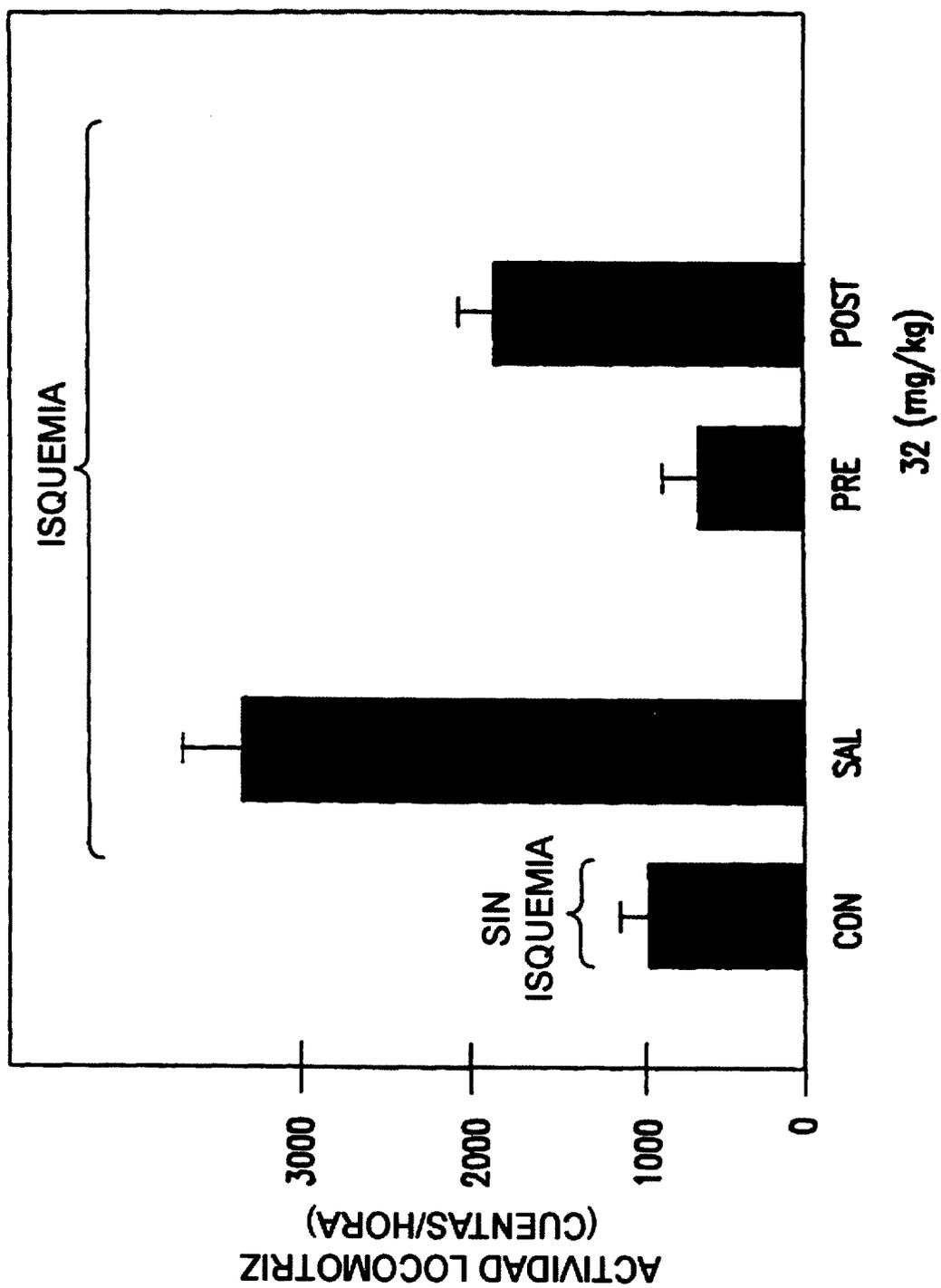


FIG.14

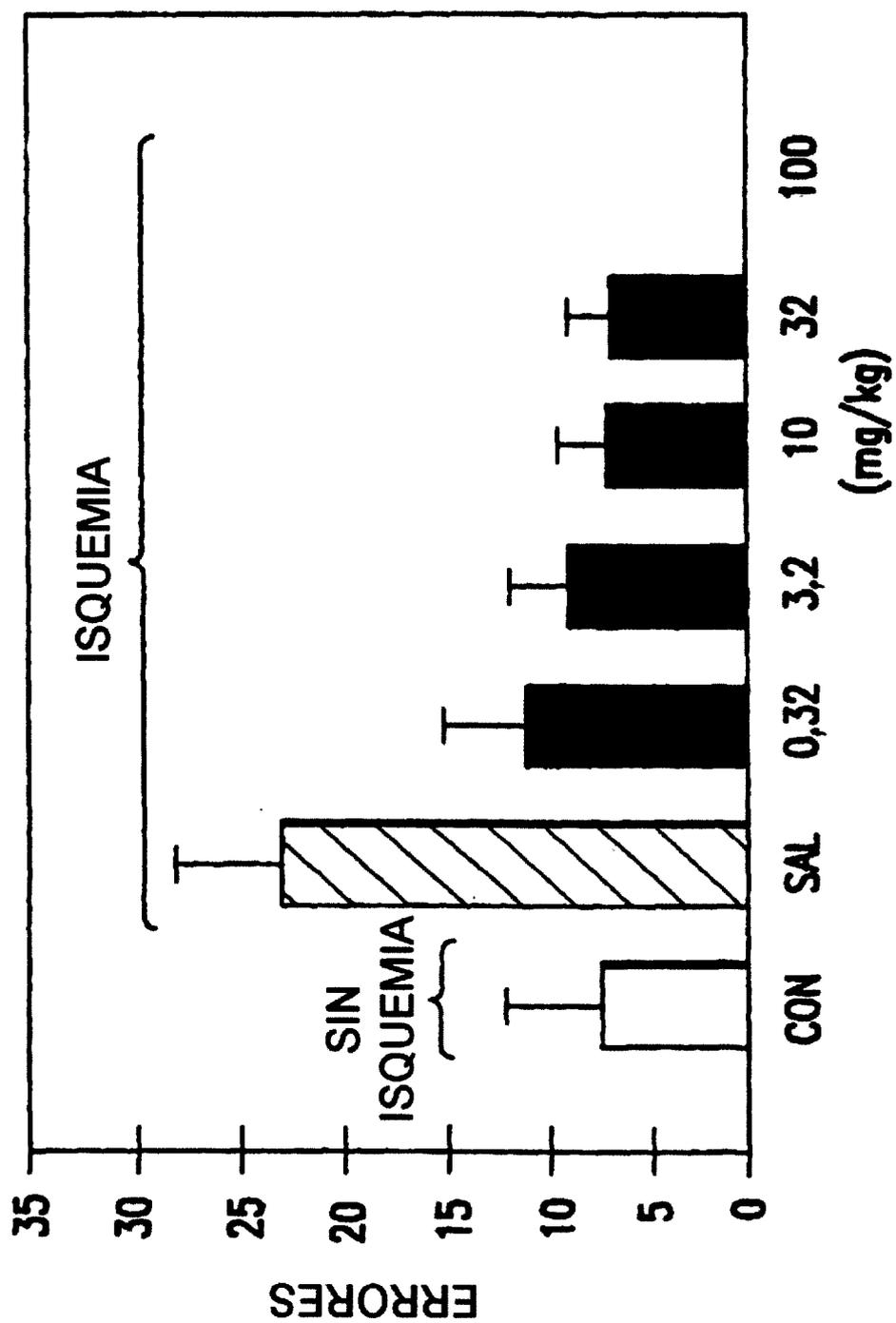


FIG.15

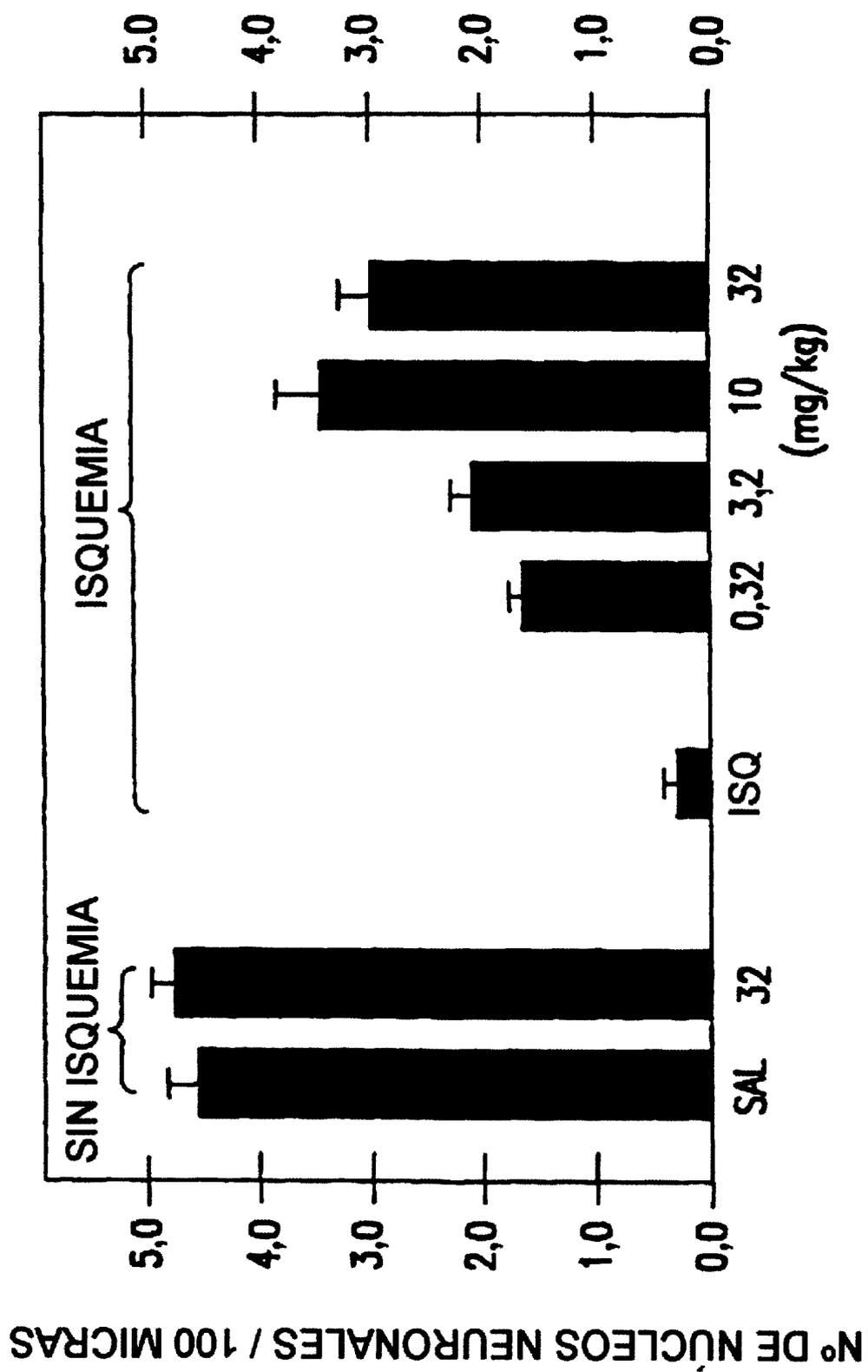


FIG.16

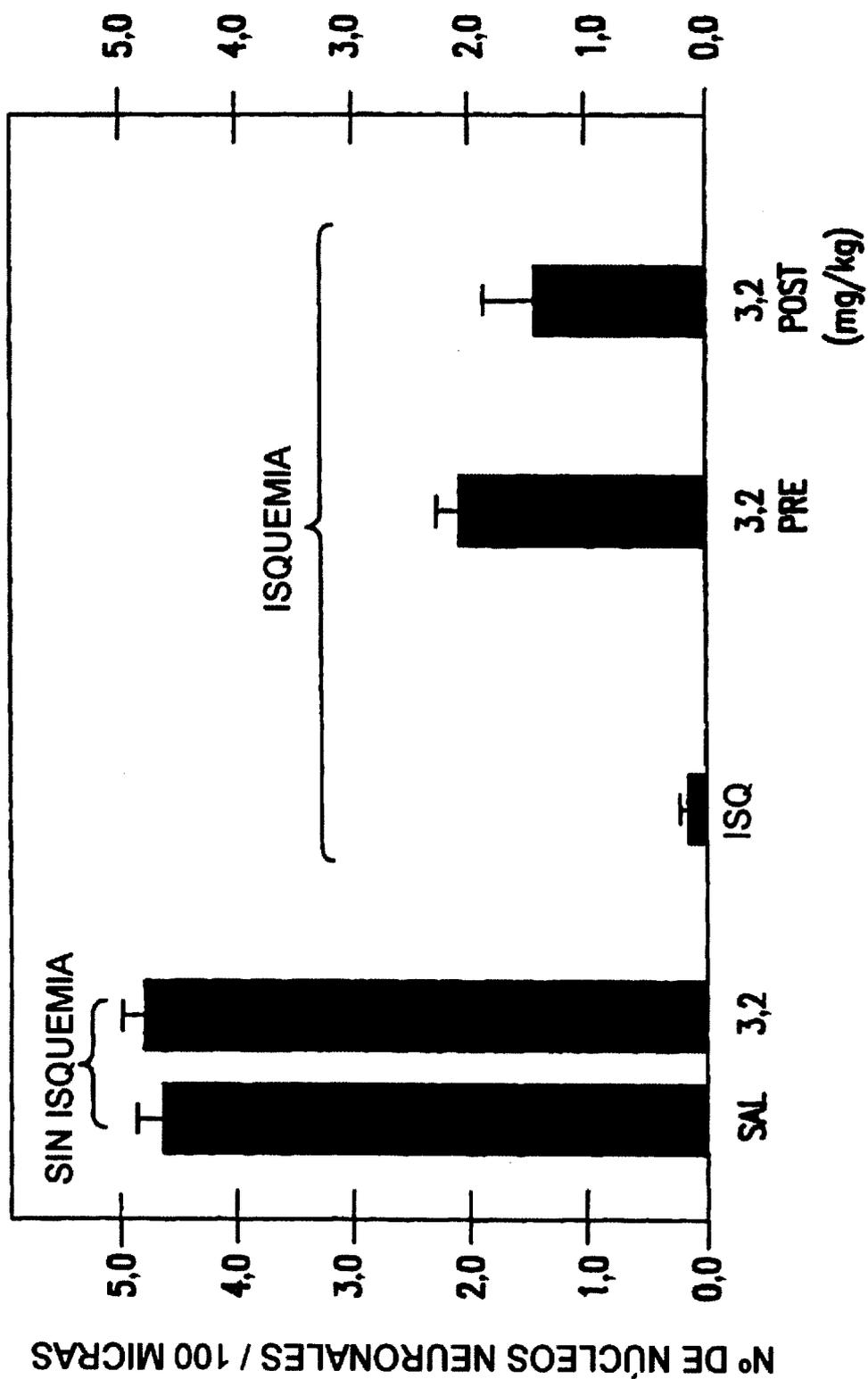


FIG.17

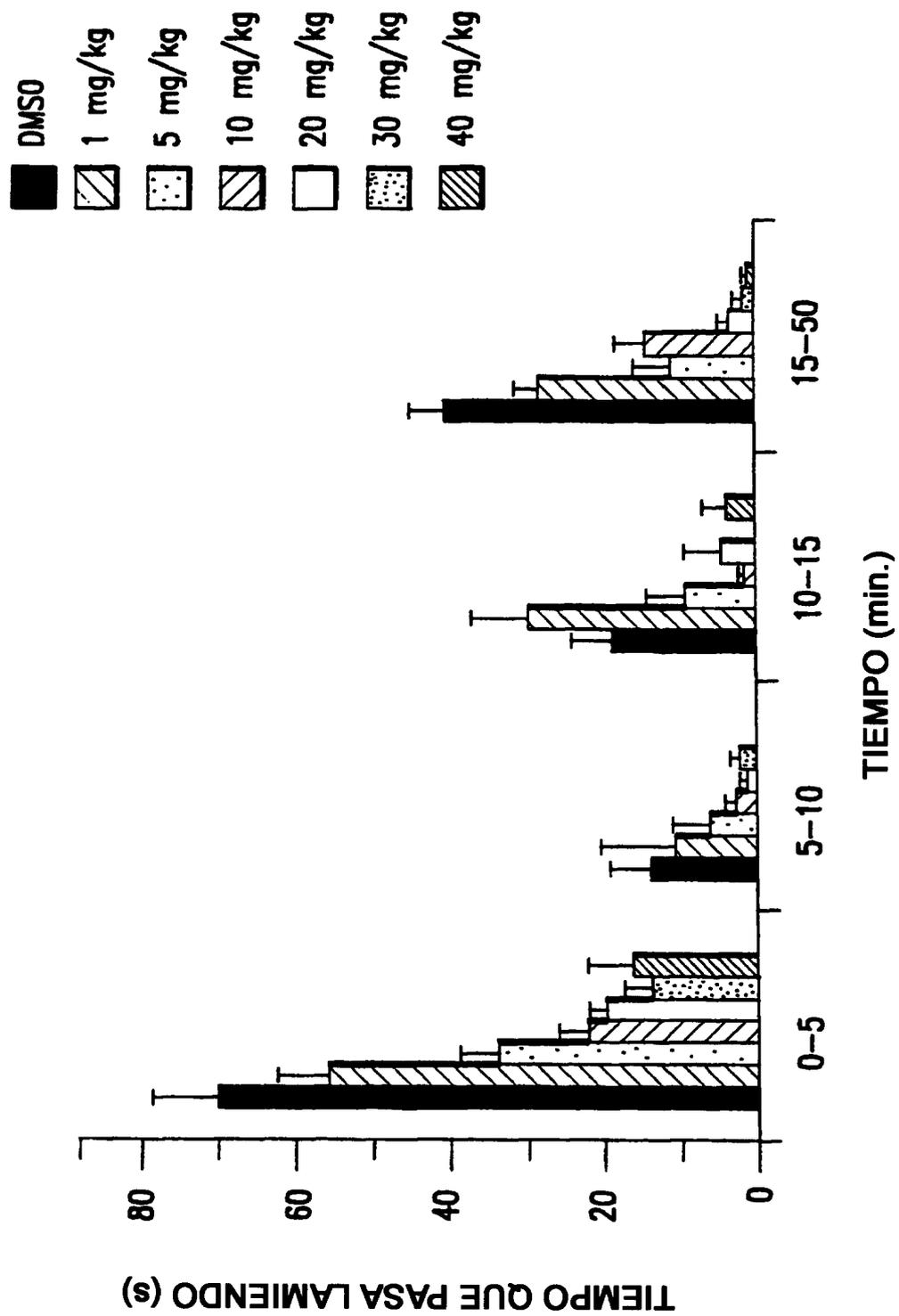


FIG.18

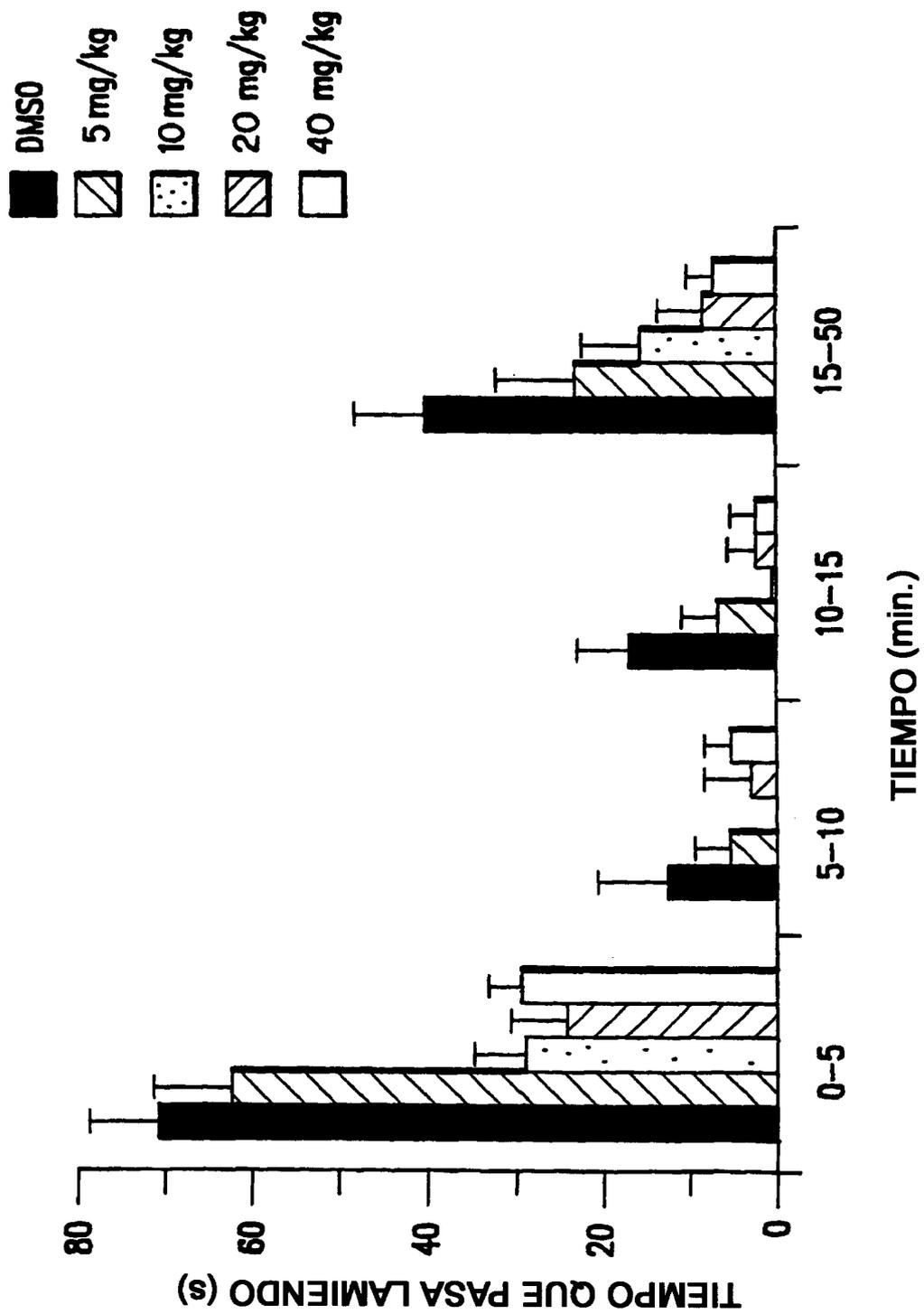


FIG.19

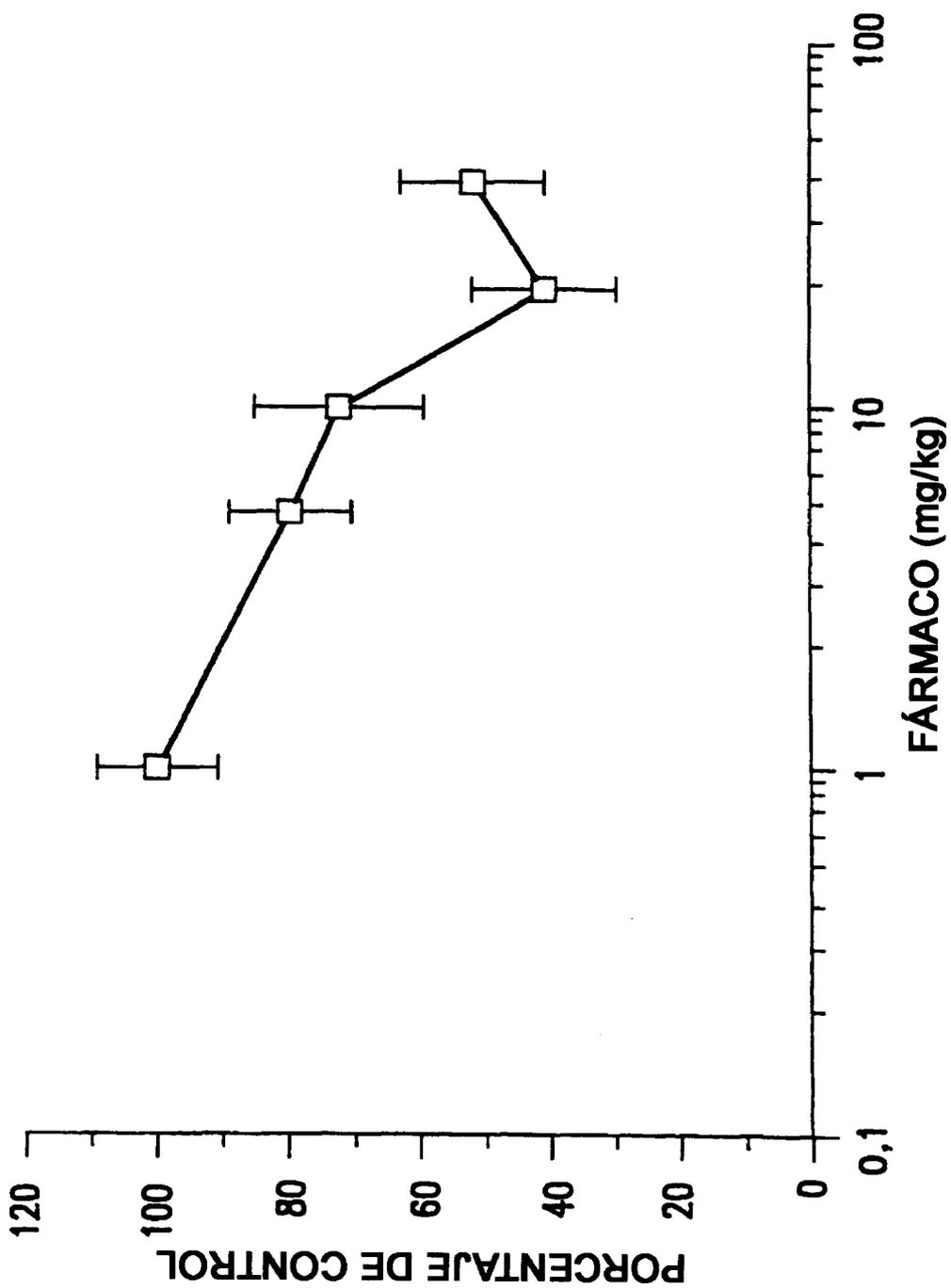


FIG.20A

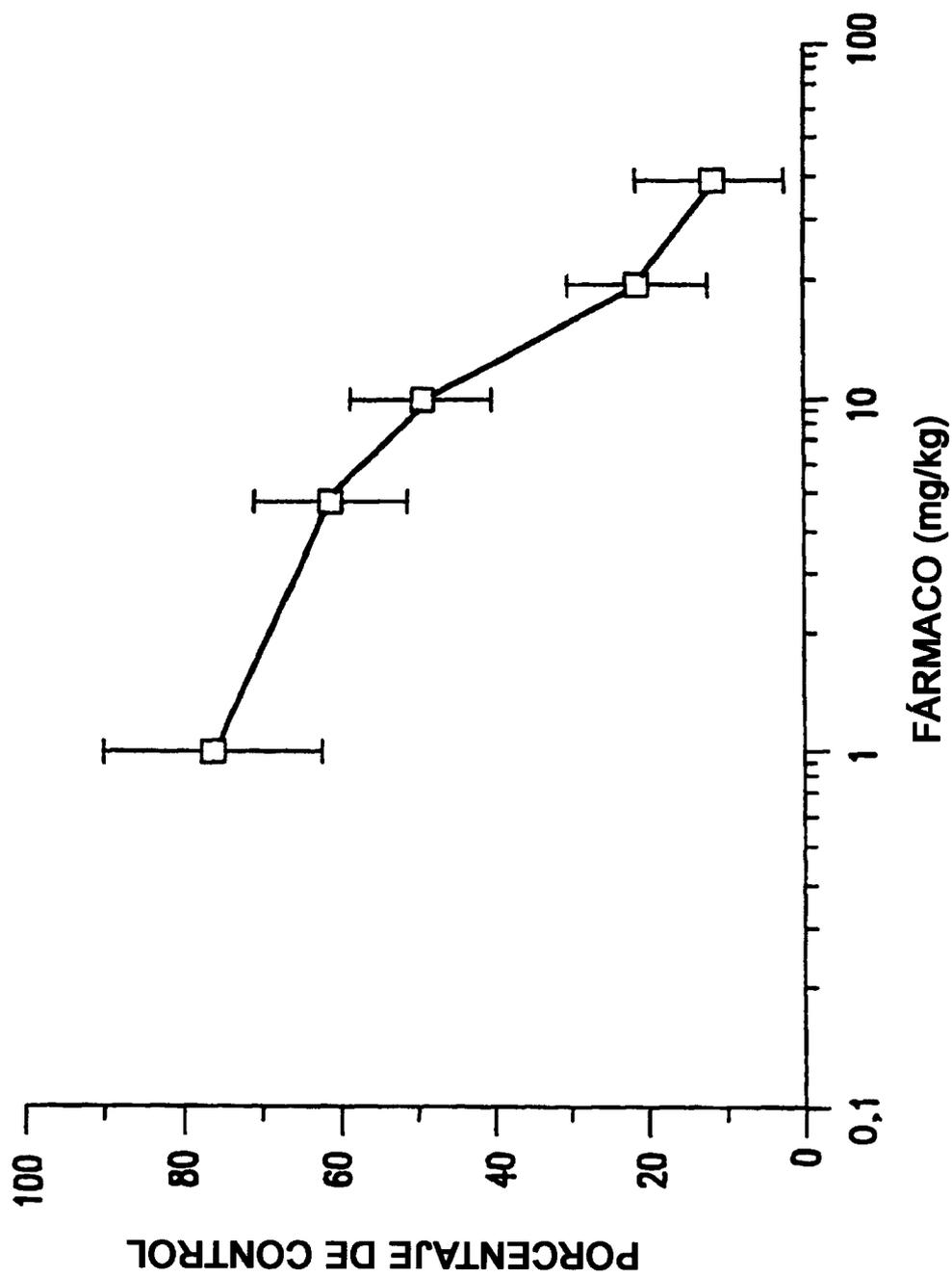


FIG.20B

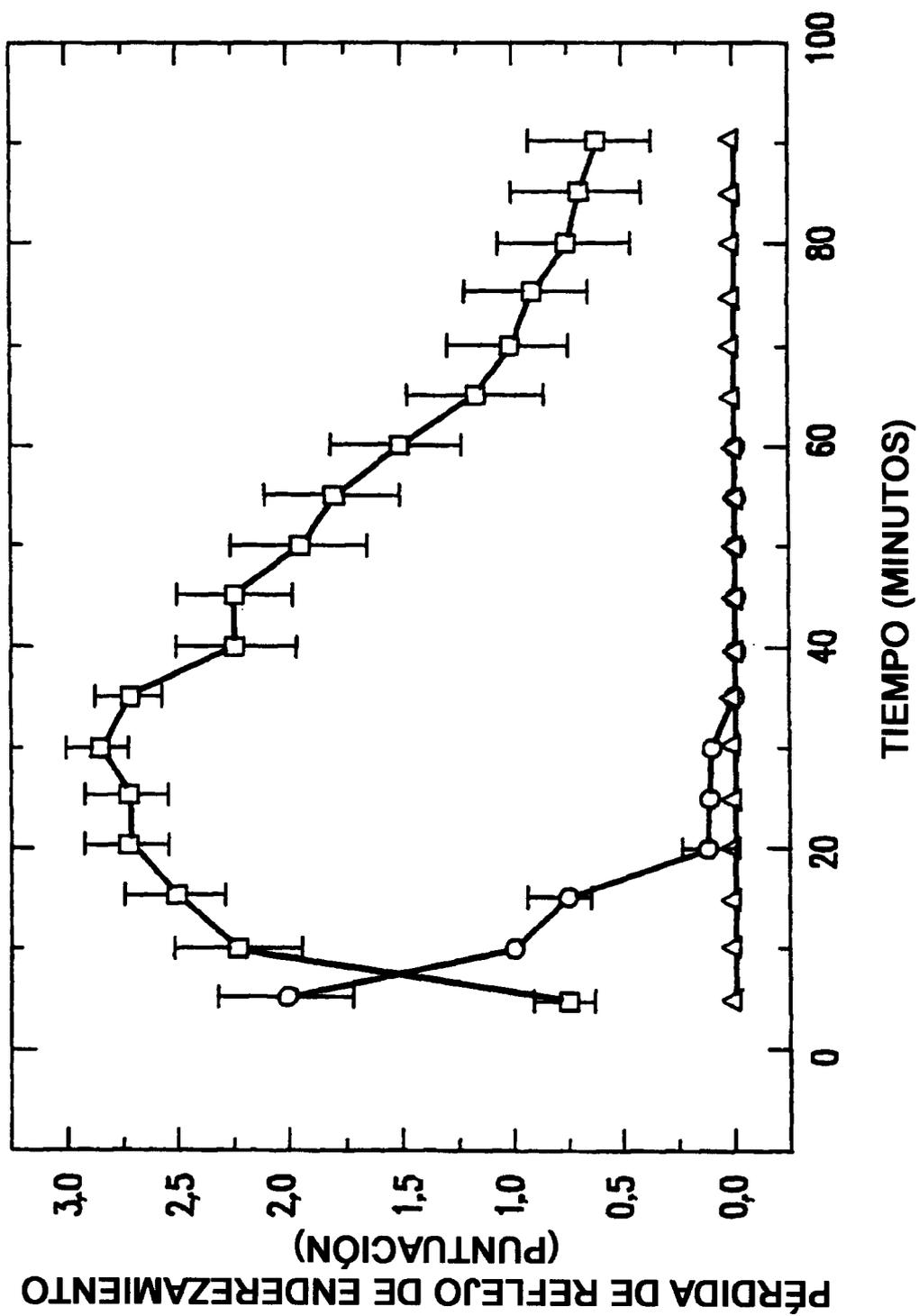
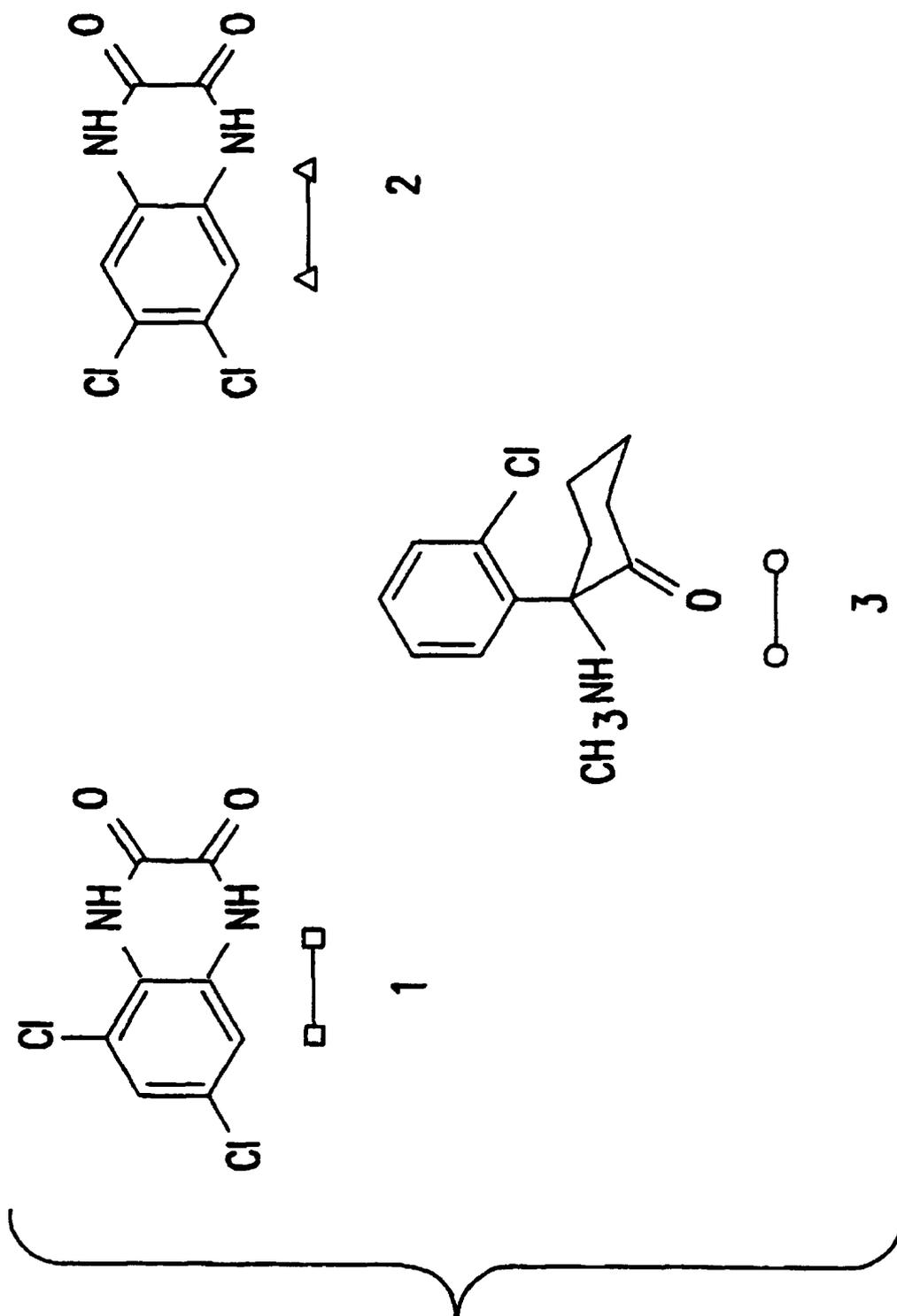


FIG.22A



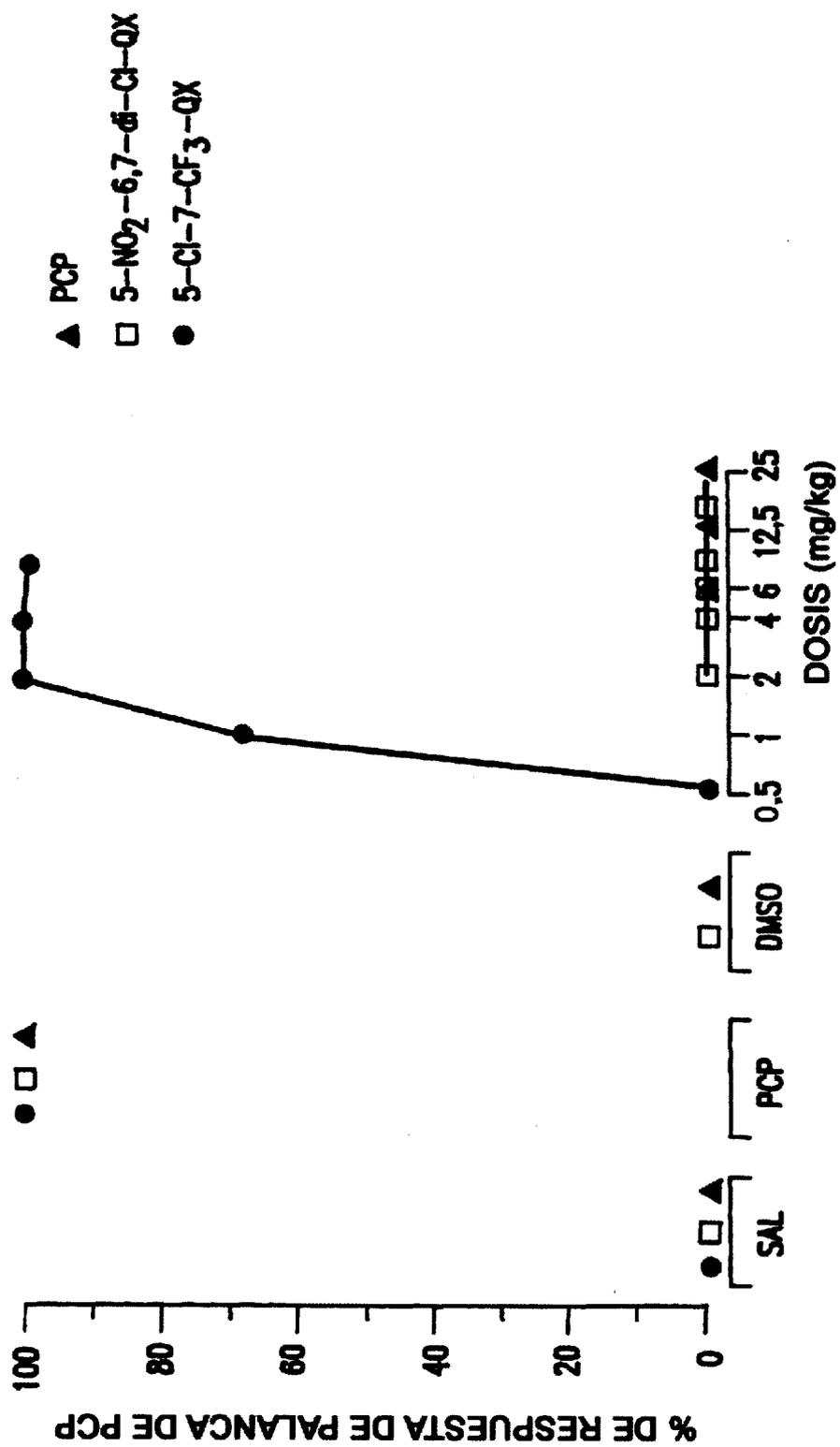


FIG.23A

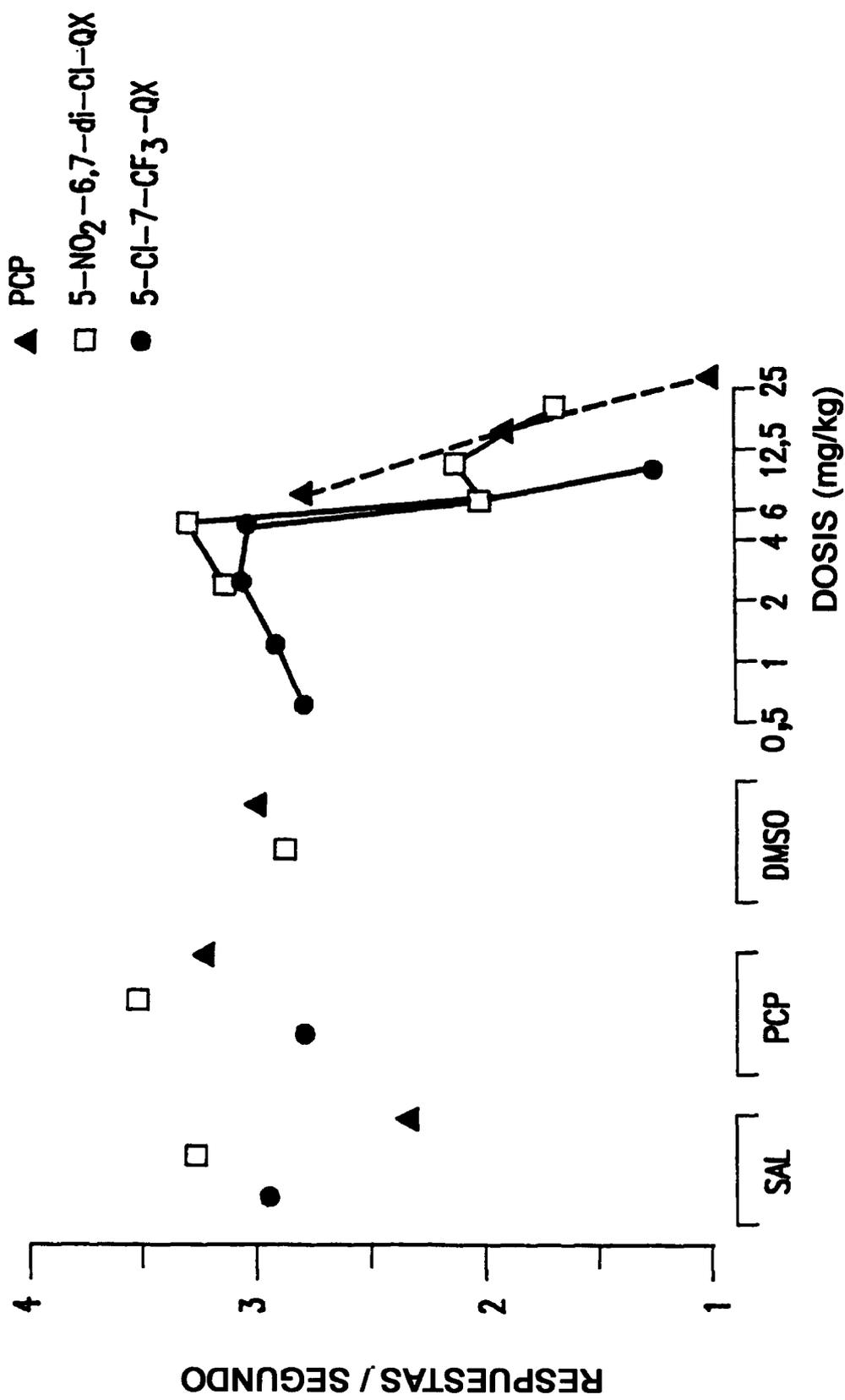


FIG.23B

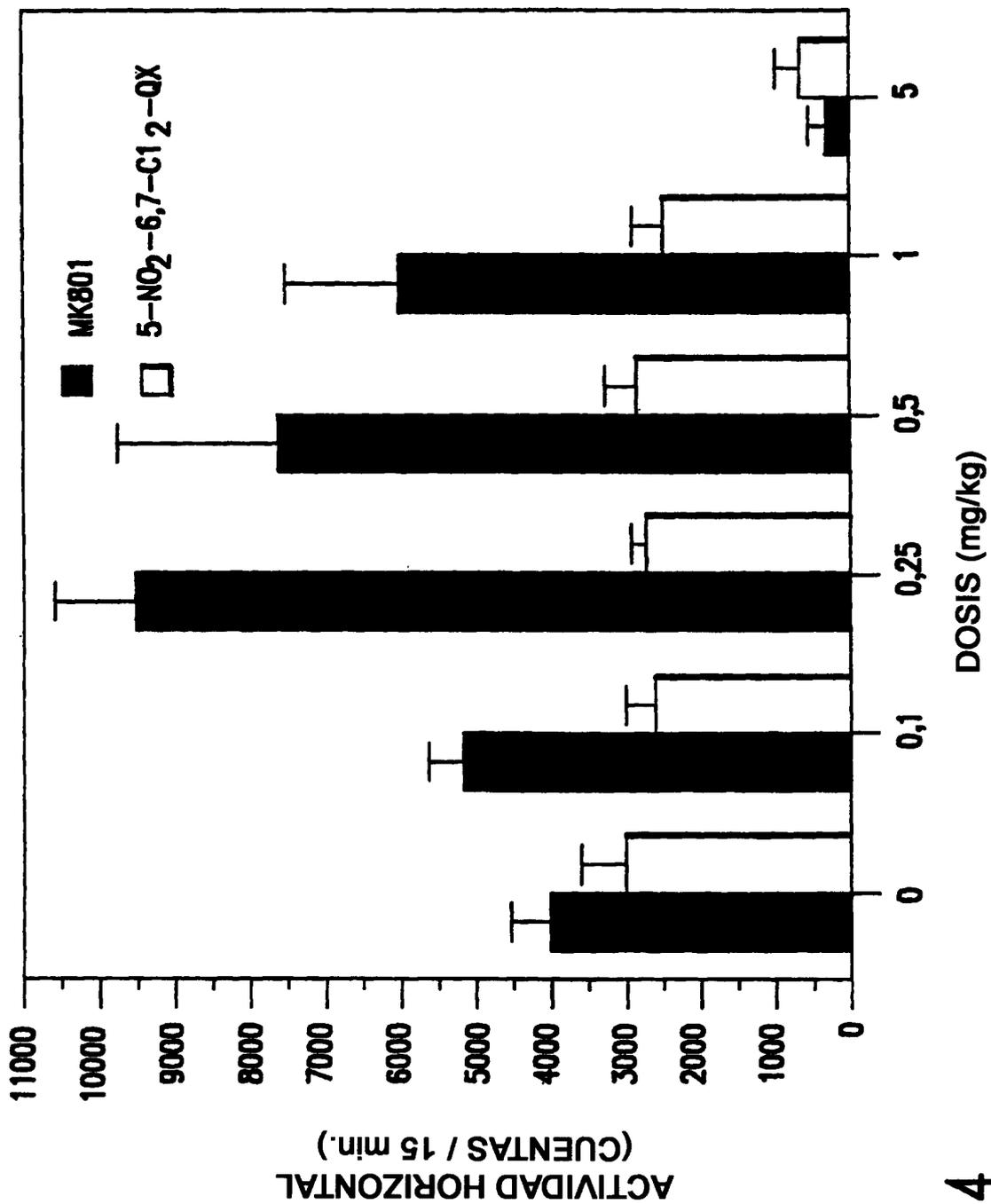


FIG.24