



ESPAÑA

(10) ES	(11) NUMERO	(10) A1
(21)	449.870	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	16-7-76	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
596,543	16-7-75	Estados Unidos

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	COD;AGAK	

(54) TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVAS QUINOXALINAS CONDENSADAS

(71) SOLICITANTE (S)
ELI LILLY AND COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
307 East McCarty Street, Indianapolis Indiana 46206, Estados Unidos.

(72) INVENTOR (ES)
Jack Beuford Campbell, estadounidense.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1                    Recientemente, los agentes inmunosupresores se  
han vuelto importantes debido a su uso durante los trans-  
plantes de órganos de un ser humano a otro y, en particular  
5                    en conexión con las operaciones de transplantes de órganos  
tales como los transplantes de corazón y de riñón. Es parte  
del mecanismo de defensa de los seres humanos eliminar los  
antígenos extraños (en el caso, producidos por el órgano  
transplantado) por medio de la reacción inmunológica. Por  
lo tanto, en todas las operaciones de transplante de órga-  
10                   nos, ha sido necesario administrar grandes dosis de un inmu-  
nosupresor antes de la operación y continuar la administra-  
ción posteriormente a fin de evitar que el huésped rechace  
el órgano del donador.

15                    La respuesta inmune está compuesta de una secuen-  
cia de transformaciones celulares y eventos bioquímicos que  
conducen a una respuesta bimodal a las sustancias extrañas  
(antígenos). Las células que participan en la respuesta se  
desarrollan de las células de vástagos que se originan en  
la médula ósea y se siembran afuera en los órganos linfoides  
20                    periféricos. Desde estos últimos sitios, después del es-  
timulo antigénico, la respuesta del cuerpo se monta en la  
forma de células plasmáticas (que producen el anticuerpo) y  
linfocitos inmunes específicos. El anticuerpo es liberado en  
el sistema circulatorio y por lo tanto puede actuar a cierta  
25                    distancia de la célula productora (inmunidad humoral). Los  
linfocitos inmunes específicos también entran en el sistema  
circulatorio y actúan en el sitio de la lesión (inmunidad  
celular). La reacción del anticuerpo con el antígeno impul-  
sa la liberación de histamina de los leucocitos basofílicos;  
30                    la histamina, a su vez, altera la permeabilidad de los vasos

1 sangíneos, acelerando el influjo tanto del anticuerpo como  
de los linfocitos inmunes específicos en los sitios de la  
lesión. Por lo tanto, la respuesta inmune está compuesta  
de una serie de eventos bioquímicos en una secuencia de cé-  
5 lulas en diversos sitios del cuerpo. Puede alterarse --su-  
primirse, en el caso de los compuestos que se discuten en  
la presente-- en un número de sitios de desarrollo bioquí-  
mico o celular.

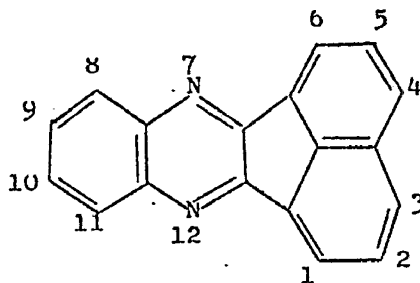
10 Las antihistaminas afectan solamente una reac-  
ción secundaria en la respuesta inmune, no teniendo efecto  
directo sobre las células que producen los anticuerpos o  
sobre los linfocitos inmunes específicos. Un número de agen-  
tes, comunmente en uso como drogas inmunosupresoras, actúan  
adicionalmente de nuevo en la cadena de eventos que se de-  
15 nomina en la presente la respuesta inmune. Ciertos esteroi-  
des antiinflamatorios, por ejemplo, la cortisona, suprimen  
la producción de anticuerpos y linfocitos inmunes específi-  
cos, pero también disminuyen radicalmente el tejido linfói-  
de normal y tiene otros efectos secundarios indeseables.  
20 Ciertas drogas antineoplásicas, por ejemplo, la azatioprina,  
la ciclofosfamida y el metotrexato, se emplean como inmunosu-  
presores, pero también disminuyen el tejido linfóide normal  
y disminuyen radicalmente otras células derivadas de la mé-  
dula ósea. La citototoxicidad general de las últimas drogas es  
25 esperada en vista de que han sido seleccionadas con base en la  
toxicidad contra un espectro de tipos de células.

30 Un objeto de esta invención consiste en propor-  
cionar un procedimiento para preparar nuevos compuestos que  
alteran la respuesta inmune en los mamíferos actuando sobre  
las células que funcionan en la respuesta inmune, pero que

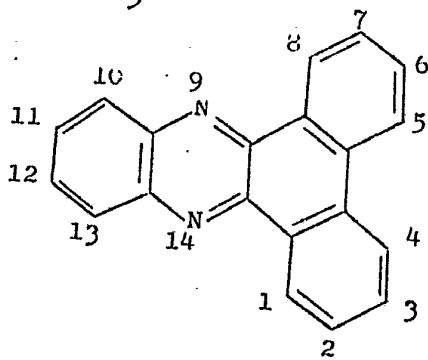
1 evitan ciertos efectos secundarios y otros atributos inde-  
seables de los compuestos comunmente disponibles como inmu-  
no-reguladores.

5 Los compuestos de quinoxalina se conocen en el  
arte y pueden prepararse por medio de la condensación de  
una o-diamina aromática con 1,2-dicetona. La preparación  
general de las quinoxalinas se describe en "The Chemistry of  
Heterocycle Compounds", Vol. 5, Capítulos 2438 A. Weis-ber-  
ger, Ed., (Interscience Publishers, Inc, New York, 1953).  
10 Cuando las dicetonas acenaftalenquinona o fenantrenquinona  
se condensan con o-fenilendiaminas, los productos son, res-  
pectivamente, acenafto/[1,2-b]quinoxalinas o dibenzo:[a,c]  
fenazinas. La acenafto/[1,2-b]quinoxalina se describe en Ber.  
43, 441 (1910) y la dibenzo[a,c]fenazina se describe en Ann.  
15 237, 341 (1887).

Las acenafto/[1,2-b]quinoxalinas se denominan y  
se numeran de acuerdo con el Índice de Anillos, de la Socie-  
dad Química Americana, número 5998 y las dibenzo[a,c]fena-  
zinas se denominan y se numeran de acuerdo con el Índice de  
20 Anillos, número 6221, como sigue:



Acenafto/[1,2-b]quinoxalinas



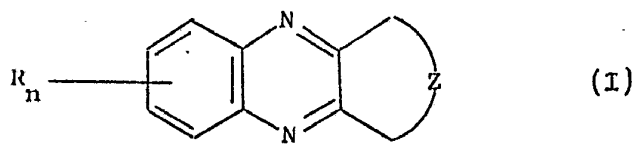
1

5

Dibenzo/a,c/fenazinas

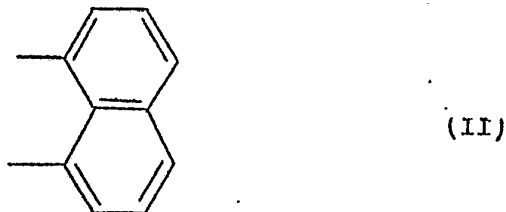
Esta invención proporciona un procedimiento para preparar nuevas quinoxalinas condensadas de fórmula general

10

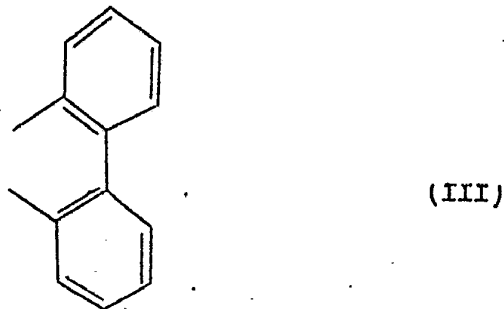


en donde R es trifluormetilo, n es 1 ó 2; y Z es

15



20

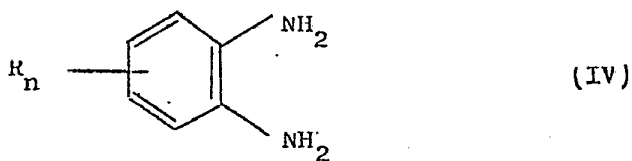


25

el cual está caracterizado por la condensación de una diamina aromática de fórmula general

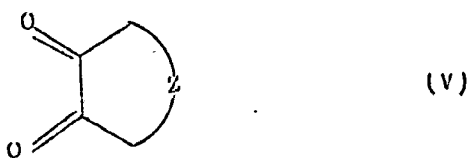
30

1



5

en donde R y n son como se definieron anteriormente, con una 1,2-dicetona de formula general



10

en donde Z es como se definió anteriormente.

Los compuesto de dibenzo/a,c/fenazina en donde Z es III se prefieren sobre los compuesto de acenafto/1,2-b/ quinoxalina en donde Z es II.

15

Las fenacinas y quinoxalinas representadas por la fórmula I anterior son útiles como agentes inmuno-reguladores capaces de alterar la respuesta inmune en los mamíferos.

20

Los compuestos de la fórmula I anterior se preparan por medio de la condensación de diaminas aromáticas adecuadas con las 1,2-dicetonas apropiadas. La reacción de las diaminas con la fenentrenquinona proporciona los compuestos de dibenzo (a,c)fenazina y la condensación de las diaminas con acenaftenquinona proporciona las acenafto/1,2-b/quinoxalinas. Los reactivos de cetona se pueden conseguir comercialmente.

25

30

Alternativamente, los compuestos de quinoxalina y fenazina de la fórmula I pueden prepararse a partir de los precursores de o-nitroanilina apropiados de las o-diaminas aromáticas requeridas. Por medio de este procedimiento, las

1 o-nitroanilinas se hidrogenan catalíticamente para proporci-  
onar las o-diaminas correspondientes in situ para la conden-  
sación con la cetona apropiada. Los catalizadores de hidro-  
5 genación adecuados incluyen el níquel Raney, paladio sobre  
carbono al 5 por ciento, óxido de platino, y similares. La  
nitroanilina puede hidrogenarse en la presencia del reacti-  
vo de cetona y la condensación se completa mediante celanta-  
10 miento a temperaturas elevadas. Los disolventes que son iner-  
tes a las condiciones de hidrogenación tales como el etanol  
o el tetrahidrofurano, pueden emplearse en forma adecuada  
como el medio de reacción. En lugar de la o-nitroanilina,  
puede emplearse en la reacción de condensación la o-fenilen-  
diamina apropiada. En términos generales, se emplean equiva-  
15 lentes molares del reactivo de o-fenilendiamina o de o-nitroa-  
nilina y de la dicetona. Sin embargo, puede emplearse, si se  
desea, un exceso de cualquier reactivo sin que se produzcan  
efectos adversos sobre el rendimiento. La quinoxalina o la  
fenazina producida puede recuperarse por medio de evaporación  
20 del disolvente y la purificación puede llevarse a cabo por  
medio de los métodos convencionales tales como la cristaliza-  
ción o la cromatografía.

Los compuestos de o-nitroanilina o de o-fenilen-  
diamina que se requieren como reactivos se pueden conseguir  
comercialmente o se pueden preparar por medio de los métodos  
25 conocidos de aminación, nitración o reproducción de los pre-  
cursores aromáticos adecuados. Los reactivos de benzotrifluo-  
ruro requeridos pueden prepararse por medio de la fluoración  
de los ácidos benzoicos correspondientes con tetrafluoruro de  
azufre.

30 Los compuestos de la formula I se prueban con

1 con respecto a su capacidad para reducir la producción de anticuerpos por medio de los siguientes métodos.

MÉTODOS DE PRUEBA

5 Grupos de cinco ratones suizos, machos, de 20 gramos, criados al azar, reciben inyecciones intravenosas de glóbulos rojos de oveja al  $5 \times 10^7$ . Las células para estas inyecciones se preparan de sangre de cordero (recogida en solución de Alsever) mediante tres lavados con solución salina al 0,95 por ciento y resuspensión en solución salina al  
10 0,85 por ciento. Nueve dosis diarias de los compuestos, solubilizados en polietilenglicol 400, se administran oralmente en dosis de 0,1 ml., comenzando tres días antes de la inyección de los glóbulos rojos. Se emplean varios niveles de dosis de cada droga, a incrementos dobles. Se incluye un grupo  
15 de ratones de control, que reciben una inyección de glóbulos rojos y nueve dosis diarias de vehículo en lugar de la droga. Seis días después de las inyecciones del antígeno, los ratones se hacen sangrar por medio de una punción en el corazón y se combinan los sueros de cada grupo de cinco  
20 ratones. Las combinaciones de suero, después de la inactivación de complemento, se analizan con respecto al contenido de hemaglutinina por medio de los procedimientos comunes, utilizando una mezcla de diluciones salinas dobles en serie de los sueros de prueba con suspensiones de globulos rojos de  
25 oveja al 0,5 por ciento en artesas de depresión de plástico. Después de la incubación de las artesas durante 3 horas a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ ., se clasifican los patrones de hemaglutinina. Se considera significativa una reducción de anticuerpos de cuatro veces (75 por ciento) o mayor ( en el suero de  
30 prueba comparado con el cuerpo de control). Los resultados se

1 expresan como la dosis más baja de droga que produce una reducción de anticuerpos del 75 por ciento o mayor.

5 El efecto de la administración subcutánea se determina sustituyendo las inyecciones subcutáneas por el tratamiento oral en el procedimiento anterior. El efecto de la administración intraperitoneal se determina en ratones que reciben el antígeno de glóbulos rojos intraperitoneales y dos dosis de droga, administradas intraperitonealmente 48 horas antes y después de la inyección del antígeno. En los tratamientos perenterales se emplean suspensiones de las drogas en solución salina conteniendo "Methocel" al 0,125 por ciento [metilcelulosa, 4000 centipoises (DOW)] y "Emulphor" al 0,2 [aceite vegetal polioxietilado, El 620 (GAF)], esta suspensión se denomina "Methocel-E". El sangrado y las determinaciones del anticuerpo se llevan a cabo como se indica en lo que antecede.

10

15

20 Los resultados de la prueba de los compuestos de quinoxalina y fenazina de la fórmula I con respecto a su capacidad para reducir la producción de anticuerpos, se resumen en las Tablas I y II. El punto final inmunosupresor se define como se expone anteriormente como la dosis más baja de droga que produce por lo menos una reducción de la formación del anticuerpo de 75 por ciento. La azatioprina (IMURAN), que se utiliza para la inmunosupresión clínica, tiene un punto final inmunosupresor en 100 mg/kg. en esta prueba. Se notará que los compuestos conocidos del arte anterior, la acenafto [1,2-b] quinoxalina y la dibenzo[a,c]fenazina, tienen una actividad mínima o insignificante (Tablas I y II).

25

TABLA I. Compuestos de Dibenzo (a,c)fenazina

<u>R<sub>H</sub></u>	<u>Immunosupresor</u>	<u>Punto Final (mg/kg)*</u>
<u>Sustituyente (s)</u>	<u>IP x 2 vs IP</u>	<u>Oral x 9 vs IV</u>
hidrógeno	100	100
11-trifluormetil-	0,8	3,1
10-trifluormetil-	---	6,2

\*El plan de tratamiento que se indica en el subencabezamiento, por ejemplo "IP x vs IP" indica 2 dosis administradas intraperitonealmente, 48 horas antes y después del antígeno de Globulos rojos de oveja, el cual se administra intraperitonealmente. La terapia oral se administra diariamente durante 9 días, comenzando 3 días antes del antígeno intravenoso. Los ratones se hacen sangrar al sexto día después de la administración del antígeno para un análisis de la he-maglutina<sup>40</sup>(HA). El punto final se determina por medio de la dosis más baja de droga que produce una supresión de HA de 75 por ciento o mayor, comparada con el valor de control no tratado.

1

5

10

15

20

25

30



EA I. Compuestos de Dibenzo (a.,c)fenazina

<u>Inmunosupresor</u>	<u>Punto Final (mg/kg)<sup>K</sup></u>
<u>IP x 2 vs IP</u>	<u>Oral x 9 vs IV</u>
100	100
0,8	3,1
--	6,2

se se indica en el subencabezamiento, por ejemplo "IP x vs IP" indica intraperitonealmente, 48 horas antes y después del antígeno de globulos se administra intraperitonealmente. La terapia oral se administra diariamente comenzando 3 días antes del antígeno intravenoso. Los ratones se han después de la administración del antígeno para un analisis de la he- final se determina por medio de la dosis más baja de droga que produ- 75 por ciento o mayor,, comparada con el valor de control no tratado.

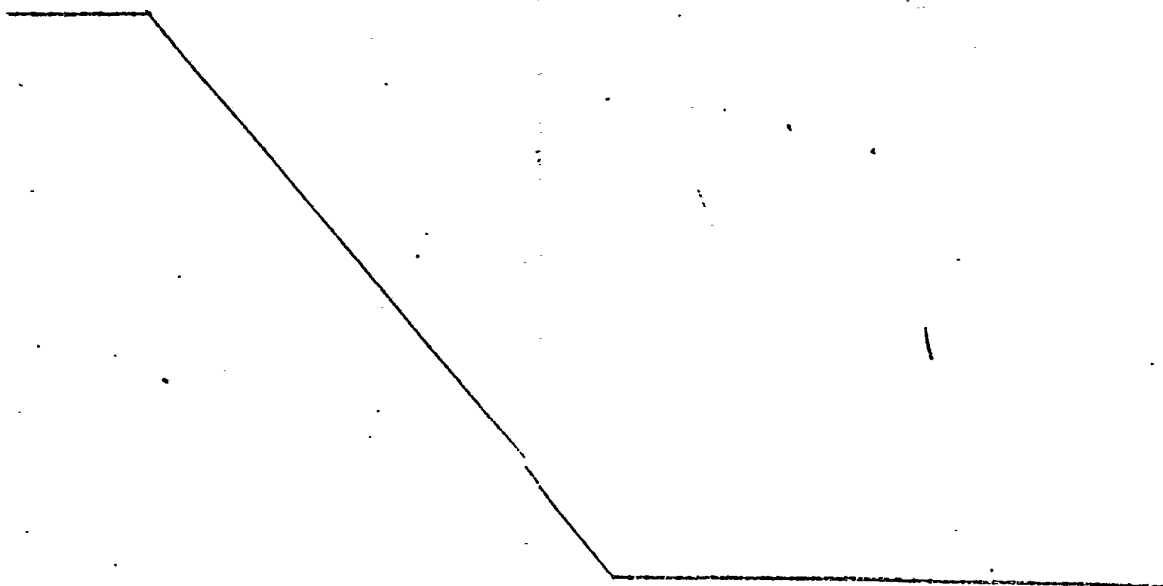


TABLA II. Compuestos de Acenarfo, 1,2-b/quinoxalina

R <sub>n</sub>	Imunosupresor	Punto Final (mg/kg)*
<u>Sustituyente (s)</u>	<u>IP x 2 vs IP</u>	<u>Oral x 9 vs IV</u>
hidrógeno	--	100
8-trifluormetil-	--	100
9-trifluormetil-	6,2	25

\* El plan de tratamiento que se indica en el subtítulo, por ejemplo, "IP x 2vs IP" indica 2 dosis administradas intraperitonealmente, 48 horas antes y después del antígeno de Globulos rojos de oveja, el cual se administra intraperitonealmente. La terapia oral se proporciona diariamente durante 9 días, comenzando 3 días antes de la administración intravenosa del antígeno. Los ratones se hacen sangrar al sexto día después de la administración del antígeno para un análisis de hemaglutinina (HA). El punto final se determina por medio de la dosis más baja de droga que produce una supresión de HA de 75 por ciento o mayor, comparada con el valor de control no tratado.

1967

1

5

TABLA II. Compuestos de Acenafto, 1,2

10

$R_n$ <u>Sustituyente (s)</u>	<u>Inmunosupresor</u> <u>IP x 2 vs IP</u>
hidrógeno	--
8-trifluormetil-	--
9-trifluormetil-	6,2

15

\* El plan de tratamiento que se indica en el subtítulo, por ej administradas intraperitonealmente, 48 horas antes y después oveja, el cual se administra intraperitonealmente. La terapia durante 9 días, comenzando 3 días antes de la administración se hacen sangrar al sexto día después de la administración de hemaglutinina (HA). El punto final se determina por medio de produce una supresión de HA de 75 por ciento o mayor, comparado.

20

25

30

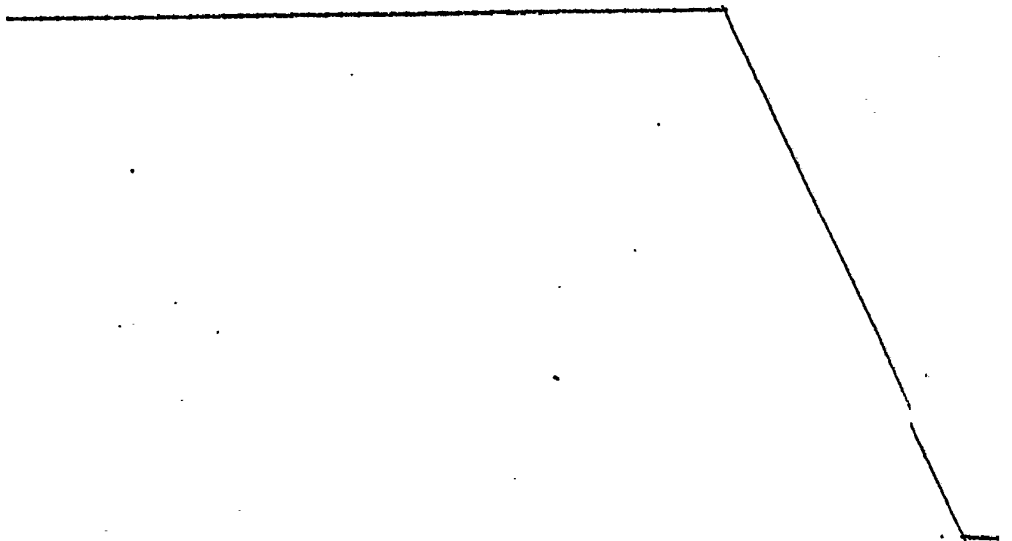
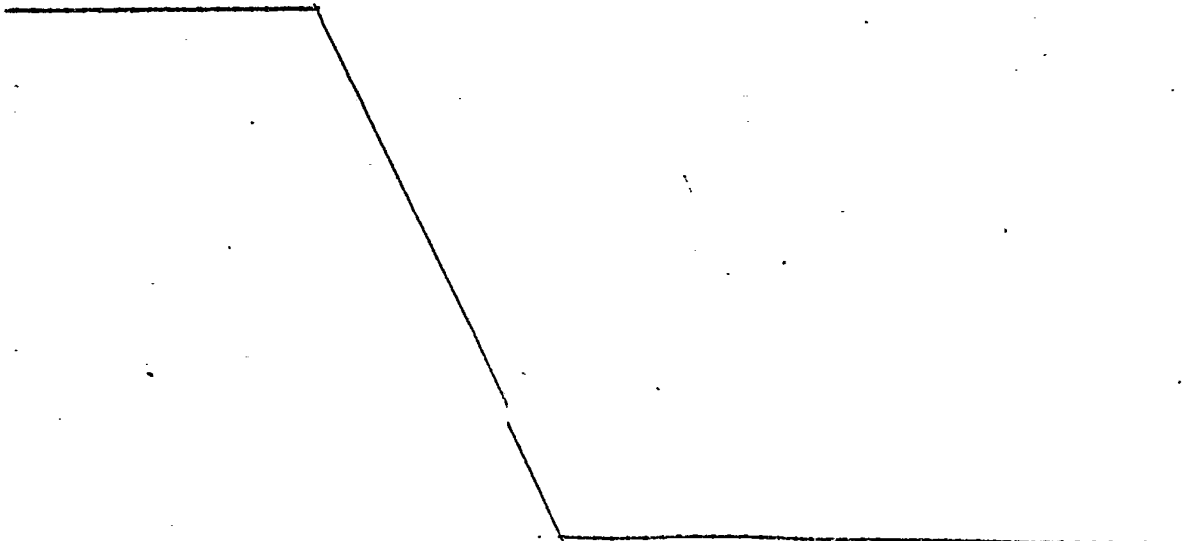


Tabla II. Compuestos de Acenafto[1,2-b]quinoxalina

Inmunosupresor	Punto Final (mg/kg) <sup>x</sup>
<u>IP x 2 vs IP</u>	<u>Oral x 9 vs IV</u>
---	100
---	100
6,2	25

Se se indica en el subtítulo, por ejemplo, "IP x 2vs IP" indica 2 dosis intraperitonealmente, 48 horas antes y después del antígeno de globulos rojos de Streptococcus intraperitonealmente. La terapia oral se proporciona diariamente durante los 3 días antes de la administración intravenosa del antígeno. Los resultados el sexto día después de la administración del antígeno para un análisis de punto final se determina por medio de la dosis más baja de droga que produce una HA de 75 por ciento o mayor, comparada con el valor de control no tra-



1 Los componentes se prueban adicionalmente por medio de un procedimiento de análisis del suero modificado en la forma que se describe a continuación.

5 Procedimiento de Analisis del Suero Individual

En estas pruebas, el procedimiento descrito anteriormente se modifica por medio del uso de grupos de 10 ratones, en lugar de grupos de 5 ratones. Los ratones se hacen sangrar como antes, pero los sueros se titulan individualmente en lugar de como una combinación. Se calculan los valores de hemaglutinina promedio ( $\log_2$ ) + S.E. para cada grupo de 10 ratones, y se determinan los valores p (por medio de la Prueba Student's T), en comparación con el grupo de control. La dosis de droga más baja ( $p < 0,01$ ) que disminuye significativamente la titulación de anticuerpo define el punto final. En algunos casos, las drogas se administran en 10, en lugar de 9, dosis diarias; en estos casos los ratones se hacen sangrar al séptimo, en lugar de al sexto, día después de la administración del antígeno. Los resultados típicos que se obtienen en la prueba de análisis del suero individual con los compuestos representativos de la formula I se resumen en la Tabla III.

25

30

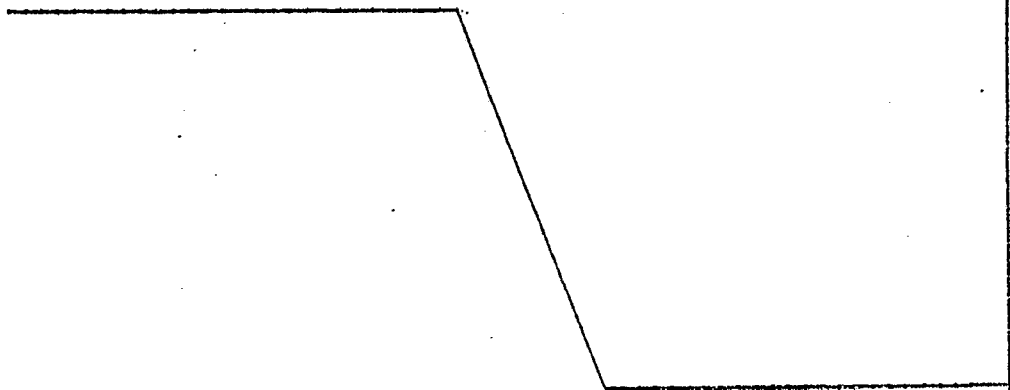


TABLA III

Actividad Inmunosupresora de los Compuestos

(Procedimiento de Análisis del Suero Individual)

Compuesto	Via	Dosis	Vehiculo	Dosis del Punto Final (p < 0,01) en mg/kg.
11-(trifluormetil)- dibenzo(a,c)fenazina	Oral	9	PEG 400 <sup>k</sup>	0,4
"	Oral	10	PEG 400	0,2
"	Oral	9	Methocel-E <sup>kk</sup>	0,8 o menos
"	Oral	10	Methocel-E	0,4
"	Oral	10	Aceite de Maiz	0,8 o menos
"	SC	10	Methocel-E	0,1
10-(trifluormetil)- dibenzo (a,c)fenazina	Oral	9	PEG 400	0,8 o menos
9-(trifluormetil)- acenafto/1,2-by quinoxalina	Oral	9	PEG 400	3,1
<sup>k</sup> polietilenglicol 400				
<sup>kk</sup> definido en la página 10.				

1

5

TABLA III

Actividad Inmunosupresora de los Compu  
(Procedimiento de Análisis del Suero Ind

10

15

20

25

30

Compuesto	Via	Dosis	Vehiculo
11-(trifluormetil)- dibenzo(a,c)fenazina	Oral	9	PEG 400 <sup>x</sup>
"	Oral	10	PEG 400
"	Oral	9	Methocel-E <sup>xxx</sup>
"	Oral	10	Methocel-E
"	Oral	10	Aceite de Maiz
"	SC	10	Methocel-E
10-(trifluormetil)- dibenzo (a,c)fenazina	Oral	9	PEG 400
9-(trifluormetil)- acenafto/1,2-b/ quinoxalina	Oral	9	PEG 400

<sup>x</sup>  
polietilenglicol 400

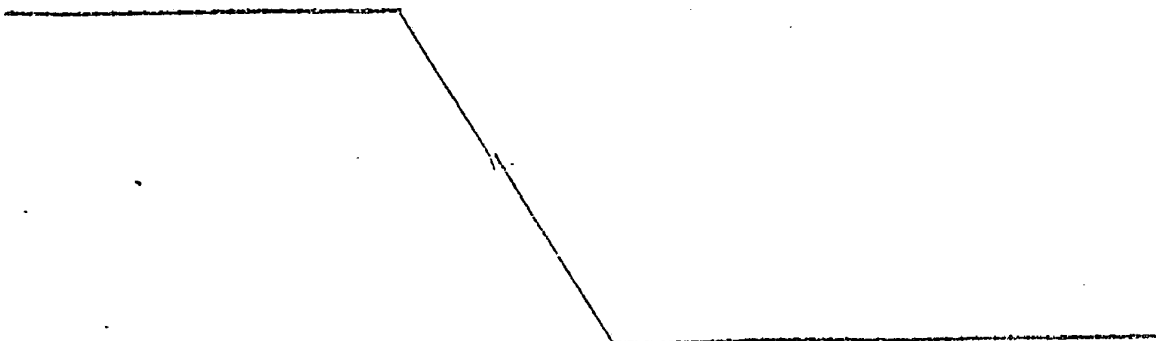
<sup>xxx</sup>  
definido en la página 10.

TABLA III

vidad Inmunosupresora de los Compuestos

dimiento de Análisis del Suero Individual)

Via	Dosis	Vehiculo	Dosis del Punto Final ( $p < 0,01$ ) en mg/kg.
Oral	9	PEG 400 <sup>*</sup>	0,4
Oral	10	PEG 400	0,2
Oral	9	Methocel-E <sup>**</sup>	0,8 o menos
Oral	10	Methocel-E	0,4
Oral	10	Aceite de Maiz	0,8 o menos
SC	10	Methocel-E	0,1
Oral	9	PEG 400	0,8 o menos
Oral	9	PEG 400	3.1



1 La acción inmunosupresora de los compuestos de la  
fórmula I en la reducción del agrandamiento del bazo en rato-  
nes inyectados con células de bajo de una clase de ratones  
que induce el injerto linfoide, se prueba por medio de un mé-  
5 todo denominado la reacción de injerto-versus-huésped.

Reacción de Injerto-Versus.Huésped (GVH)

10 En esta prueba, células de bajo de ratón paren-  
tales (C57BL) se inyectan en ratones de una clase híbrida F<sub>1</sub>  
(C57BL x C3H). Los ratones receptores no rechazan las células  
de bazo inyectadas ya que el híbrido reconoce como "propios"  
los antígenos relacionados con C57BL de su generador homocigo.  
Sin embargo, las células inyectadas montan una reacción en el  
tejido del receptor debido a los antígenos derivados de C3H  
15 extraños. Como consecuencia, se agranda el bazo del receptor.  
La inmunosupresión evita o reduce este agrandamiento. Por lo  
tanto, los pesos del brazo proporcionan una medida de la  
reacción de GVH y su reducción bajo la inmunosupresión.

20 Se emplea una modificación del procedimiento ori-  
ginal de Simonsen (Ann. N.Y.Acad.Sci. 73:834, 1958). Se obtie-  
nen grandes cultivos de células de bazo, sin el cardado ma-  
nual de los bazos generalmente empleado, utilizando mezclado-  
res Waring con las cuchillas cortantes invertidas. Dos perio-  
dos de sangrado de seis segundos sacuden los bazos (25 bazos  
25 C57BL en 25 ml. de solución salina) suficientemente para li-  
berar las células del tejido conectivo. Las suspensiones de  
células que se preparan en esta forma se uniforman, por medio  
del conteo de la cámara Levy-Hausser, para que contengan  
6 x 10<sup>8</sup> células nucleadas por ml. Grupos de cinco ratones  
30 C57Bl x C3H de 16 a 18 gramos, se inyectan intraperitonealmen-

1. te con 1 ml. de la suspensión de células del donador. El tratamiento, por la vía subcutánea en 0,2 ml., se instituye tres días antes de la inyección de células y se continúa diariamente durante 13 días. Los animales de control reciben solamente las células y el vehículo. Los bazos se separan y se pesan 10 días después de la inyección de células. Los resultados se expresan como mg. de bazo/gramo de peso del cuerpo.

5  
10 Puesto que la inyección de células singenéticas, es decir, C57BL x C3H, en los ratones receptores produce un grado menor de esplenomegalia, los pesos del bazo de dichos animales se utilizan para definir una supresión del 100% del componente GVH al calcular los porcentajes de inhibición producida por los compuestos inmunosupresores. El método de cálculo se ilustra en el siguiente ejemplo de ratones tratados con un compuesto inmunosupresor de referencia:

15

Tratamiento con el Compuesto de Referencia	Mg. de Bazo/gramo de Peso del Cuerpo ± S.E. *	Porcentaje de Inhibición **
12,5 mg./Kg. x 13	6,86 ± 0,80 ***	74
20 Ninguno (Control de GVH)	11,55 ± 1,01	0
Ninguno (Control Sin,)	5,20 ± 0,37	100
Ninguno (Control Normal)	4,16 ± 0,17	-

25 \* Valores promedio de grupos de 5 ratones.

\*\*  $\frac{\text{Control de GVH-Tratado}}{\text{Control de GVH-Control Sin.}} \times 100 = \text{Porcentaje de Inhibición}$

\*\*\*  $p < 0,01$ , comparado con el control de GVH.

30 Puesto que en la práctica se encuentra que tanto los controles singenético como normal varían solo ligeramente de prueba en prueba, se utiliza en estos cálculos un valor

1 compuesto (4,8), derivado de recalcular cuatro grupos separados de control singenético ( $5,20 \pm 0,37$ ,  $4,99 \pm 0,39$ ,  $4,42 \pm 0,13$ ,  $4,66 \pm 0,12$ ) como un grupo de 20 ratones. Los resultados que se obtienen en la reacción de injerto-versus-huesped con los compuestos de la formula I se resumen en la Tabla IV.

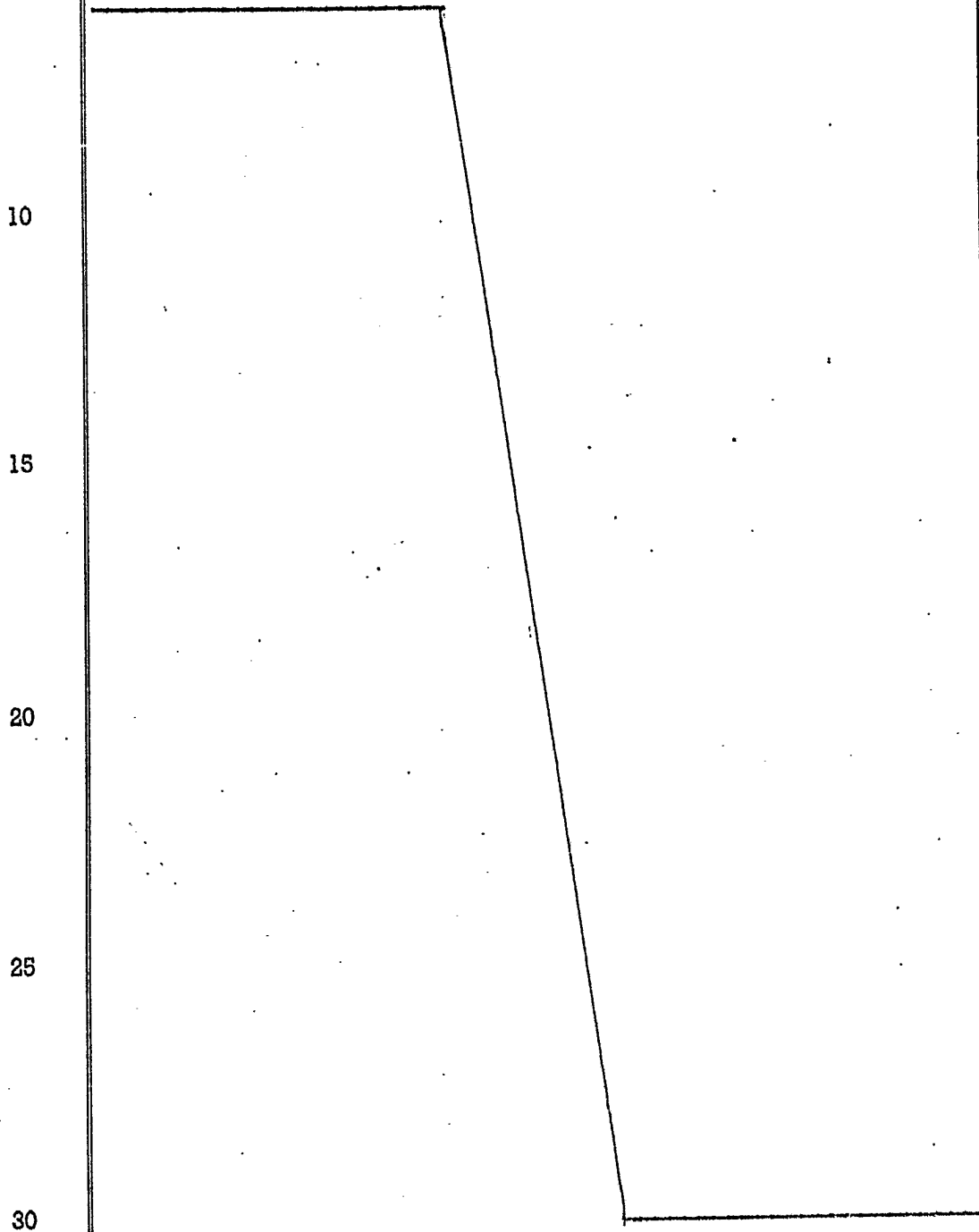


TABLA IV  
Efecto de los Compuestos de la Reacción de GVH

Druga	Dosis (mg/kg x 13)	Mg. de Bazo/Gramo de Peso del Cuerpo S.E.t	Porcentaje de Inhibición $\pm$ t
11-(trifluormetil)- dibenzo(a, c)fenazina	80	4,72 $\pm$ 0,26	101,5
11-(trifluormetil)- dibenzo(a, c)fenazina	20	5,65 $\pm$ 1,00	83,6
11-(trifluormetil)- dibenzo(a, c)fenazina	5	5,68 $\pm$ 0,26	83,0
9-(trifluormetil)- acenafto(1, 2-b)- quinoxalina	80	5,00 $\pm$ 0,19	96,1
9-(trifluormetil)- acenafto(1, 2-b)- quinoxalina	20	4,67 $\pm$ 0,17	102,5
Control	---	9,97 $\pm$ 0,49	

t Valores promedio de grupos de 5 ratones.  
 $\pm$ t Control de GVH-Tratado  $\times$  100 : Porcentaje de  
 Control de GVH-Control Sin. Inhibicion

TABLA IV

Efecto de los Compuestos de la Reac

Droga	Dosis (mg/kg x 13)	Mg. de Bazo/gran Peso del Cuerpo S
11-(trifluormetil)- dibenzo(a,c)fenazina	80	4,72 ± 0,26
11-(trifluormetil)- dibenzo(a,c)fenazina	20	5,65 ± 1,00
11-(trifluormetil)- dibenzo(a,c)fenazina	5	5,68 ± 0,26
9-(trifluormetil)- acenafto/1,2-b7- quinoxalina	80	5,00 ± 0,19
9-(trifluormetil)- acenafto/1,2-b7- quinoxalina	20	4,67 ± 0,17
Control	--	9,97 ± 0,49

\* Valores promedio de grupos de 5 ratones.

\*\*  $\frac{\text{Control de GVH-Tratado}}{\text{Control de GVH.Control Sin.}} \times 100$  : Porcentaje de Inhibicion

1

5

10

15

20

25

30

TABLA IV

Efecto de los Compuestos de la Reacción de GVH

<u>Dosis</u> (mg/kg x 13)	<u>Mg. de Bazo/gramo de</u> <u>Peso del Cuerpo S.E.±</u>	<u>Porcentaje</u> <u>de</u> <u>Inhibición ±±</u>
80	4,72 ± 0,26	101,5
20	5,65 ± 1,00	83,6
5	5,68 ± 0,26	83,0
80	5,00 ± 0,19	96,1
20	4,67 ± 0,17	102,5
—	9,97 ± 0,49	

pos de 5 ratones.

$\frac{\text{Sin.}}{\text{Sin.}} \times 100$  : Porcentaje de Inhibición



1 En virtud de su capacidad para suprimir la res-  
puesta inmune, los compuestos de quinoxalina y de fenazina  
de la fórmula I son adecuados para pretratar pacientes que  
sufren de cirugía de transplante de órganos. Además de su uso  
5 en las operaciones de transplante de órganos, los agentes in-  
muno-reguladores también son útiles en varias enfermedades  
que tienen una etiología que se entiende poco, denominadas  
genéricamente como enfermedades, "auto-inmunes". Estas enfer-  
medades incluyen: anemia hemolítica auto-inmune, púrpura  
10 trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso, hepatitis lu-  
poide, lupus nefritis, glomerulonefritis, el síndrome nefrótico,  
co, el síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener,  
escleroderma, enfermedad de Sezary, psoriasis, uveítis, ar-  
tritis reumatoide, colitis ulcerativa, tiroiditis y orquitis  
15 contagiosa. Los agentes auto-inmunosupresores, tales como el  
azatiapreno, generalmente pueden ser más o menos útiles en  
el tratamiento de las enfermedades anteriores dependiendo del  
grado en el cual la enfermedad dependa de un mecanismo auto-  
inmune.

20 Las vías de administración de los nuevos compues-  
tos de quinoxalina y fenazina incluyen las vías oral y subcu-  
tánea. Para la administración oral, el inmunosupresor puede  
disolverse o suspenderse en polietilenglicol. También son  
útiles los vehículos acuosos, a los cuales pueden agregarse  
25 agentes tensioactivos. Para la inyección subcutánea se utili-  
za una solución isotónica. El agente inmunosupresor está  
presente en el vehículo particular en la cantidad de desde 1  
hasta 200 mg/ml.

30 Los siguientes ejemplos son ilustrativos adicio-  
nales de los métodos, intermediarios y preparación de los

1 compuestos de la formula I.

EJEMPLO 1

5 0,1 moles, 20,6 gramos de 4-amino-3-nitrobenzo-  
trifluoruro se hidrogenan a temperatura ambiente en 100 ml.  
de etanol absoluto con 1,5 gramos de paladio sobre carbono  
(5 por ciento) a  $3,44 \times 10^6$  dinas/cm<sup>2</sup>. Se absorben tres equi-  
valentes de hidrógeno y la temperatura se eleva a 70°C. El  
catalizador se filtra y el filtrado se agrega a una suspen-  
sión caliente de 20,8 gramos (0,10m) de feantrenquinona en  
10 2 litros de etanol con agitación.

Después de la adición de la solución de 3,4-di-  
aminobenzotrifluoruro, los reactivos se disuelven y pronto  
después empieza a precipitarse el producto. La reacción se  
completa mediante calentamiento a reflujo durante aproxima-  
15 damente una hora. El producto precipitado se recoge mediante  
filtración para dar aproximadamente 27,8 gramos (80 por cien-  
to de rendimiento) de 11-(trifluormetil)dibenzo[a,c]-fenazina  
con punto de fusión de 190-192°C.

Análisis C<sub>21</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub> PM 348

20 Calculado: C, 72,41; H, 3,18; N, 8,04;

Encontrado: C, 72,39; H, 3,05; N, 8,21.

EJEMPLO 2

25 Nueve gramos (0,05 m) de ácido 2-cloro-3-nitro-  
benzoico, 27 gramos (0,25 m) de tetrafluoruro de azufre y 5  
gramos de fluoruro de hidrógeno anhidro, se calientan en un  
autoclave cerrado a una temperatura de 150°C., durante 16 ho-  
ras. Después de enfriarse y ventilarse, la mezcla de reaccion  
se recoge en acetato de etilo. La solución de acetato de etilo  
30 se lava sucesivamente con hidróxido de sodio diluido y agua.

1 La fase de acetato de etilo se seca y se evapora al vacío para dar 2-cloro-3-nitrobenzo-trifluoruro crudo.

5 11,2 gramos (0,05 m) de 2-cloro-3-nitrobenzo-trifluoruro, 200 ml. de amoníaco líquido y 200 ml. de etanol absoluto, se calientan en un autoclave cerrado a una temperatura de 100°C., durante 4 horas. Después de enfriarse y ventilarse, la mezcla de reacción se diluye con agua. La mezcla acuosa se extrae con acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se lava con agua, se seca y se evapora al vacío para dar 2-amino-3-nitrobenzotrifluoruro crudo.

10 Cuando se hacen reaccionar 0,034 moles de cada uno de los siguientes compuestos: 2-amino-3-nitrobenzotrifluoruro y fenantrenquinona, por medio del procedimiento del Ejemplo 1, se obtienen 9 gramos (76 por ciento de rendimiento) de 10-(trifluorometil)dibenzo[*a,c*]fenazina, con punto de fusión de 195-196°C.

15 Analisis  $C_{21}H_{11}F_3N_2$  PM 348

Calculado: C, 72,41; H, 3,18; N, 8,04;

Encontrado: C, 72,24; H, 3,29; N, 7,97.

20 EJEMPLO 3

Acenaftenquinona, 9,1 gramos (0,05 m) y 10, 3 gramos (0,05 m) de 4-amino-nitrobenzotrifluoruro se hidrogenan a temperatura ambiente en 125 ml, de etanol absoluto con 2,5 gramos de paladio sobre carbono (5 por ciento) a  $3,44 \times 10^6$  dinas/cm<sup>2</sup>. Después de 4 horas se absorben tres equivalentes de hidrogeno y la temperatura se eleva a 40°C. El catalizador se filtra y el filtrado se diluye con 1,2 litros de etanol. La reacción de completa mediante el reflujo de la solución etanólica durante aproximadamente una hora. El producto precipitado se recoge para dar aproximadamente 8 gramos (50 por

1 ciento de rendimiento) de 9-(trifluorometil)acenafto[1,2-b]quinoxalina, con punto de fusión de 185-186°C.

Analisis  $C_{19}H_9F_3N_2$  PM 322

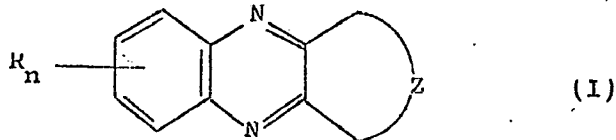
Calculado: C, 70,81; H, 2,81; N, 8,69;

5 Encontrado: C, 70,64; H, 3,01; N, 8,97.

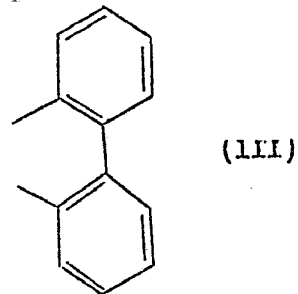
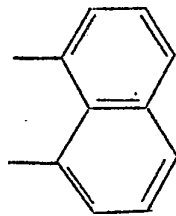
En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1.- Un procedimiento para la preparación de nuevas quinoxalinas condensadas de formula general:



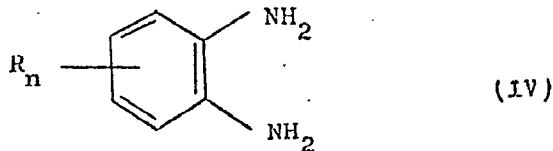
15 en donde R es trifluorometilo, n es 1 ó 2; y Z es



20

el cual está caracterizado por la condensación de una diamina aromática de la formula general:

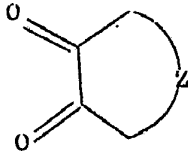
25



30

en donde los diversos símbolos son como se definieron anterior-

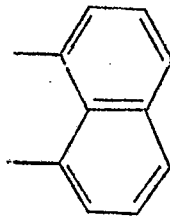
1 mente, con una 1,2-dicetona de la formula general



(V)

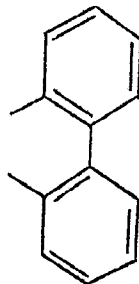
5 en donde Z es como se definió anteriormente, en presencia de un disolvente organico, inerte y opcionalmente, a temperatura elevada.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde Z es



(II)

10 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde Z es



(III)

15 4. El procedimiento según la reivindicación 2 para preparar 9-(trifluormetil)acenafto[1,2-b]quinoxalina, el cual está caracterizado por la condensación de 3,4-diaminobenzotri-fluoruro con acenaftenquinona.

20 5.- El procedimiento según la reivindicación 3, para preparar 11-(trifluormetil)dibenzo[a,c]fenazina, el cual está caracterizado por la condensación de 3,4-diaminobenzotri-fluoruro con fenantrenquinona.

25 6.- El procedimiento según la reivindicación 3 para preparar 10-(trifluormetil)dibenzo[a,c]fenazina, el cual está caracterizado por la condensación de 2,3-diaminobenzotri-fluoruro con fenantrenquinona.

30 7.- Se reivindica por último como objeto sobre el

1 que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita  
por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVAS QUINO-  
XALINAS CONDENSADAS".

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en  
la Presente Memoria descriptiva que consta de veintitres  
páginas mecanografiadas.

Madrid, 16 de julio de 1.976

BERNARDO UNGRIA

P.P.



10

15

20

25

30