

24 ABR. 1963

A 67159
Case 19084 MB(LIR)



284757

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 1 de Febrero de 1963, con el nº 284.757

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

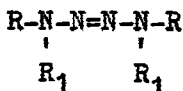
a nombre de: AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en, Berdan Avenue, Township of Wayne, Nueva Jersey, E.U.A., por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA COMPOSICION DE MATERIA DESTINADA A SUPRIMIR EL DESAROLLO DE NEOPLASMAS"

Este invento se refiere a nuevas composiciones útiles para reprimir el desarrollo de neoplasmas y, más particularmente, a nuevas composiciones que contienen ciertos tetrazenos sustituidos como ingrediente activo esencial y un vehículo para el mismo.

5

Hemos descubierto, de acuerdo con el presente invento, que los compuestos de la fórmula:

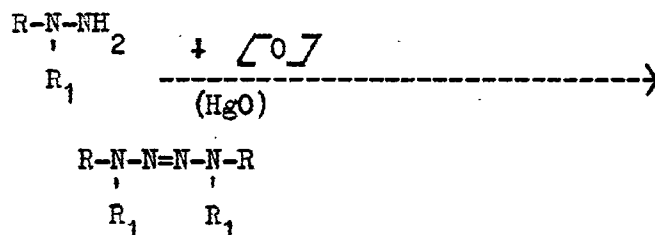


10



donde R es un miembro del grupo constituido por fenilo y p-nitrofenilo, y R₁ es un miembro del grupo constituido por metilo y etilo, son agentes muy útiles para la remisión de tumores.

Estos compuestos pueden prepararse por oxidación de una hidrazina adecuada de acuerdo con la ecuación siguiente:



donde R y R₁ tienen las significaciones dadas arriba.

La reacción se realiza convenientemente en un disolvente inerte, tal como benceno, tolueno, xileno, cloroformo, o análogo, a temperatura de reflujo (50° a 120° C.), durante un período de tiempo comprendido entre unos pocos minutos y varias horas, aproximadamente. Como agente oxidante se prefiere el óxido mercúrico.

La utilidad de las composiciones de este invento se demuestra por su acción en la inhibición del crecimiento de adenocarcinoma mamario C₃H 72 J en ratones. Los tumores de ratones donadores se cortan y se transplantan las partículas, usando un trócar, y se insertan por vía subcutánea en la región axilar de una cepa de ratones consanguínea C₃H. Cuando los tumores han crecido hasta tamaño palpable (17 días), se agrupan los ratones de ensayo con arreglo al tamaño del tumor, y se comienza el tratamiento. Preferiblemente, el tratamiento se hace por inyección intrape-



ritoneal (suspensión en almidón). La recogida del tumor se hace al séptimo día después del primer tratamiento. Los tumores se pesan después de excisión, y se determina la "relación de actividad" siguiente sobre un máximo de tres pruebas separadas:

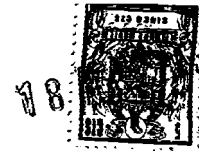
$$\text{Relación de actividad} = \frac{\text{Peso promedio de tumores de ratones de control}}{\text{Peso promedio de tumores de ratones tratados}}$$

Los compuestos se consideran activos siempre que la primera "relación de actividad", C/T, excede de 3,72, ó los productos de los valores C/T subsiguientes son iguales o mayores de 9,94 (2 pruebas) ó 19,1 (tres pruebas). Los tres compuestos de este invento son activos intraperitonealmente según la medición arriba indicada.

Los tetrazenos sustituidos pueden administrarse por vía oral o parenteral a ratones en dosis individuales comprendidas entre 1, aproximadamente, y 250 mg./kg.

Si se quiere preparar composiciones farmacéuticas para administración terapéutica, pueden incorporarse los tetrazenos sustituidos con excipientes farmacéuticos, y usarse por ejemplo, en forma de tabletas, cápsulas, píldoras, polvos, suspensiones, etc. Se sobreentenderá que, además del medicamento, pueden usarse los aglutinantes, cargas, lubricantes, agentes de desintegración, etc. clásicos.

Los tetrazenos sustituidos pueden administrarse también por vía parenteral disolviendo o suspendiendo los compuestos en un líquido adecuado, tal como propilenglicol



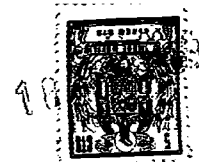
o polietilenoglicol, o disolviendo o suspendiendo los com-
puestos en una solución acuosa de dichos agentes. Otros
vehículos convenientes que pueden usarse son: lactato de
5 etilo, succinato de etilo, sulfóxido de dimetilo, hexame-
tilfosforoamida, aceite de sésamo, aceite de cacahuate,
etanol o almidón. Si estuviera indicada la administración
terapéutica, pueden obtenerse preferiblemente composicio-
nes o preparados de acuerdo con el presente invento de tal
modo que una forma de unidad de dosificación contenga, apro-
ximadamente, de 1 a 250 miligramos del ingrediente activo.
10 El régimen de dosificación puede ajustarse de manera que
proporcione una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo,
pueden administrarse varias dosis diariamente o puede re-
ducirse proporcionalmente la dosis según lo indiquen las
exigencias de la situación terapéutica.
15

El invento se describirá con mayor detalle en rela-
ción con los siguientes ejemplos específicos.:

EJEMPLO 1

1,4-Dimetil-1,4-di(-p-nitrofenil)-2- tetrazeno

20 Se tratan 19,2 gr. (0,115 moles) de la hidrazina,
en 650 ml. de benceno caliente en porciones, con 50 gr.
(0,23 moles) de óxido mercuríco amarillo. Calentando a
reflujo bajo un colector de humedad, resultan 1,6 ml. de
25 agua. El lodo se separa por filtración y se lava con ben-
ceno caliente. El filtrado y los lavados se concentran y
se enfrían, dando un polvo de color rojo púrpura, 4,0 gr.,
p.f. 151-153° C. que, según indica el punto de fusión mixto
con una muestra auténtica, es N-metil-p-nitroanilina. La
30 extracción repetida del lodo mercurio-óxido mercuríco con



nitrobenceno caliente y enfriamiento da un total de 2,9 gr. (6,6%) de agujas finas de color naranja, p.f. 240-241 e.

5. Análisis: Calculado para $C_{14}H_{14}N_6O_4$: C, 50,91; H, 4,27; N, 25,45; Encontrado: C, 50,51; H, 4,24; N, 25,94.

EJEMPLO 2

Transplante de tumor

10 Se selecciona un ratón con un tumor firme, se le mata por dislocación cervical y se sumerge en Hyamine al 2% durante 1 minuto. Después se corta el tumor bajo condiciones relativamente asépticas. El tumor cortado se coloca en una placa petri llenada con solución salina estéril y se corta en piezas de tamaño aproximado de 2 mm.

15 Cada una de las partículas que ha de usarse se coloca dentro del cañón de un trócar estéril de calibre 13. Cada trócar se introduce luego subcutáneamente a través de la piel de la región lumbar dorsal y la punta se lleva a la

20 región axilar donde se deposita la implantación. Los ratones implantados se conservan durante 17 días. Al final de de este período, se palpan los tumores y luego se clasifican según el tamaño: pequeño, medio o grande. Después se distribuyen al azar los animales de cada categoría de tamaño de tumor, en grupos de tratamiento, con controles

25 apropiados.

Ensayo de respuesta de dosis.

30 Se distribuyen al azar, en grupos de 6, ratones C_3H que tienen tumores 72 J de 17 días. Cada ensayo consta de

284757



un control y de 3 a 5 niveles de tratamiento comprendidos entre 10 y 250 mg/Kg., según la droga. Los compuestos 1,4-dimetil-1,4-difenil-2-tetrazeno; 1,4-dietil-1,4-difenil-2-tetrazeno; y 1,4-dimetil-1,4-di(4-nitrofenil)-2-tetrazeno se administran intraperitonealmente una vez cada día, durante 6 días. Al séptimo día se cortan los tumores y se pesan. Los resultados se expresan como relación de eficacia de los pesos de tumor control/tratado. Los resultados se dan en la Tabla I a continuación. Se observa que todos los compuestos acusan actividad anti-tumoral. Los resultados con los compuestos de tetrazeno no fueron chocantemente respondiente a la dosis y son de menor magnitud que los observados con tio-tepa(N,N',N"-trietileno-tiofosforemida usada como compuesto patrón). Sin embargo, los efectos de los compuestos de tetrazeno sobre la supervivencia de ratones que tenían tumores son mucho más notables.

284757

Resultados resumidos obtenidos con experimentos de respuesta a la dosis

Cl. Número	Número de ensayos	Dosis diaria mg/Kg.	Número de muertes Número tratado	AVD ^h (gramos)	Relación de eficacia promedio
Tio-tepa	11	6	16/66	5.0	15.3
		4	4/66	3.4	10.5
		2.67	3/66	2.5	7.2
		1.75	5/66	1.9	4.8
		1.19	1/66	1.2	3.3
1,4-dimetil-1,4-difenil-2-tetrazeno.	3	150	3/18	-0.3	4.4
		100	2/18	-0.3	3.6
		67	1/18	-0.1	3.8
		45	0/18	0.1	4.0
		30	0/18	0.4	3.5
1,4-Dimetil-1,4-di(4-nitrofenil)-2-tetrazeno	1	99	2/6	4.0	4.22
		33	1/6	2.7	1.60
		11	0/6	1.7	1.92
1,4-Dimetil-1,4-difenil-2-tetrazeno	1	250	1/6	-2.8	2.81
		50	0/6	0	1.45
		10	0/6	-0.3	2.60

AVD = Cambio promedio de peso de controles menos ratones tratados

Relación de eficacia = Peso medio de tumor de control / peso medio de tumor tratado

224757

Experimentos de supervivencia



Los experimentos para determinar el tiempo medio de supervivencia de animales con tumores tratados se realizaron como sigue: cada ensayo se compone de 6 niveles de tratamiento graduados. En cada uno de los grupos de tratamiento hay de 5 a 8 ratones que tienen tumores de tamaño medio (determinado por palpación). La administración de dietas con droga es continua. Los animales se tratan por vía intraperitoneal o subcutánea una vez al día hasta el día de la muerte del 5º ratón, en cuyo momento se termina el tratamiento. El intervalo de tiempo comprendido entre la fecha de implantación de tumor y el día de la muerte del ratón medio se designa tiempo de supervivencia medio.

En la Tabla 2 se dan los resultados de estudios de supervivencia. Se observa que las supervivencias medias máximas, por término medio, de ratones tratados con 1,4-dimetil-1,4-difenil-2-tetrazeno y 1,4-dietil-1,4-difenil-2-tetrazeno son mayores que las obtenidas con tio-tepa. Hay que advertir que el 1,4-dimetil-1,4-difenil-2-tetrazeno es efectivo cuando se da por vía intraperitoneal o subcutánea o se administra en la dieta. Aunque el 1,4-dimetil-1,4-difenil-2-tetrazeno y el 1,4-dietil-1,4-difenil-2-tetrazeno acusan sólo una respuesta moderada en estudios de respuesta de dosis, parecen superiores a tio-tepa en estudios de supervivencia usando ratones C₃H que tienen tumores 72 J.

284757

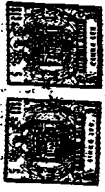


TABLA 2

Detos de supervivencia de ratones con tumores mamarios 72 J

Administración	Nº de exp.	Me-tapa Supervivencia mediana máxima	Supervivencia control
Intraperitoneal i.p.	5	49 días	35
Subcutánea s.cu.	4	54 días	31
Pienso de fuerza	3	56 días	36
Dieta	-	-	-

1,4-dimetil-1,4-difenil-
di(4-nitrofenil)-
-2-tetrazeno
Nº de Supervivencia
exp. mediana máxima

Nº de exp.	Supervivencia mediana máxima	Supervivencia control	Nº de Supervivencia exp. mediana máxima
6	60 días	35	1
2	69 días	29	
-	-	-	
2	123 días	40	

1,4-dimetil-1,4-
di(4-nitrofenil)-
-2-tetrazeno
Nº de Supervivencia
exp. mediana máxima

Nº de exp.	Supervivencia mediana máxima	Supervivencia control	Nº de Supervivencia exp. mediana máxima
6	60 días	35	1
2	69 días	29	
-	-	-	
2	123 días	40	

284757

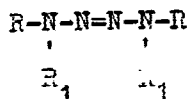


Esta solicitud, que corresponde a la presentada en E.U.A. el 14 de Mayo de 1962, bajo el número 194.656, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Un procedimiento para preparar una composición de materia destinada a suprimir el desarrollo de neoplasmas, que comprende mezclar un excipiente farmacéuticamente aceptable con un compuesto de la fórmula:



donde R es fenilo o p-nitrofenilo y R₁ es metilo o etilo.

2.- Un procedimiento según el punto 1, en el cual la composición contiene entre 1 aproximadamente y 250 aproximadamente mg. por unidad de dosificación del ingrediente activo esencial.

3.- Un procedimiento según el punto 1, en el cual el ingrediente activo es 1,4-dimetil-1,4-difenil-2-tetrazeno.

4.- Un procedimiento según el punto 1, en el cual el ingrediente activo es 1,4-dietil-1,4-difenil-2-tetrazeno.

5.- Un procedimiento según el punto 1, en el cual el ingrediente activo es 1,4-dimetil-1,4-di(4-nitrofenil)-

24



-2-tetrazeno.

6.- Un procedimiento según cualquiera de los puntos anteriores en el cual el vehículo farmacéuticamente aceptable incluye glicol propilénico o glicol polietilénico.

5 7.- Un procedimiento para preparar una composición de materia destinada a suprimir el desarrollo de neoplasmas.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

10 Esta Memoria consta de once hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

24 ABR. 1963

P. A.

Alberto de Euzkadi
C. de Euzkadi

284757