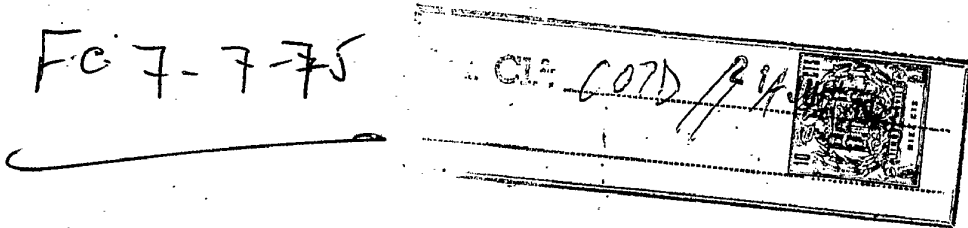


417142

417142

PATENTE DE INVENCION

Br.118.



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS DE LA
PIRIMIDINA.-

Solicitante: LABAZ, entidad francesa, residente en Avenue Pierre
ler de Serbie 39, 75 Paris 8e, Francia.-

Esta invención se refiere a un procedimiento para la obtención de nuevos derivados de la piridina que tienen actividad farmacológica.

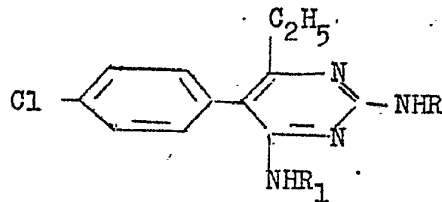
Los nuevos derivados de la pirimidina a los que se refiere la invención pueden representarse con la fórmula gene-

5.



ral:

5.



I

10.

en la que R representa un grupo dipropilacetilo, tripropilacetilo, 2-etil-2-butyl-acetilo o 2-metil-2-pentil-acetilo y R_1 representa hidrógeno o un grupo dipropilacetilo, tripropilacetilo, 2-etil-2-butyl-acetilo o 2-metil-2-pentil-acetilo.

15.

También se incluyen dentro del ámbito de la presente invención las sales ácidas de adición simples (mono) y dobles (di) farmacéuticamente aceptables de los derivados de la pirimidina representados por la Fórmula I.

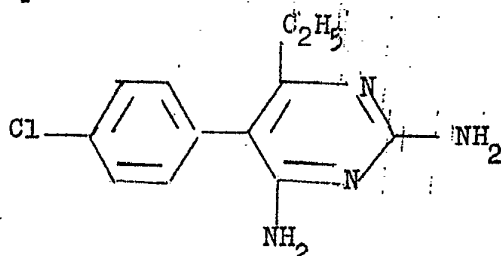
20.

Los compuestos de la Fórmula I pueden prepararse por calentamiento, en presencia o no de un disolvente tal como, por ejemplo, piridina y, si es preciso, en presencia de una base alifática terciaria fuerte tal como, por ejemplo, trimetilamina o trietilamina, 2,4-diamino-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (que tiene el nombre aprobado (B.P.) de Pyrimethamine) de fórmula.

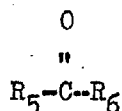
417142



5.

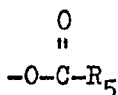


con la cantidad adecuada de un compuesto de fórmula general



10.

donde R_5 representa un grupo 2-heptilo, 3-heptilo, 4-heptilo o 4-(4-propil)-heptilo y R_6 representa un átomo de cloro o bien



15.

donde R_5 tiene el mismo significado que en la fórmula II, para formar el derivado mono- o di- sustituido requerido de la fórmula I en forma de base libre que, si se desea, se hace reaccionar con una cantidad estequiométrica de un ácido orgánico o inorgánico que formar una sal ácida de adición del

20.

mismo, simple o doble, farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de compuesto II utilizado será tal que 1 ó 2 equivalentes molares del mismo reaccionen con 1 equivalente molar de pirimetamina. Durante la reacción, se forma un ácido que puede ser inorgánico (cuando el compuesto de fór-

417142

- 4 -



mula II es un anhídrido). Este ácido puede neutralizarse en el medio de reacción por un exceso de pirimetamina o por una base alifática terciaria tal como, por ejemplo, la trimetilamina o la trietilamina.

5. Entre los compuestos representados por la fórmula II, se conocen todos los cloruros así como los anhídridos en los que R_5 representa 3-heptilo y 4-heptilo. Los anhídridos en los que R_5 representa 2-heptilo o 4-(4-propil)-heptilo pueden prepararse por el método descrito en Helv. Chim. Acta 45 (1962), 717-737.

10. En el caso de diacilación de la pirimetamina por el radical dipropilacetilo, la 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina obtenida presenta un fenómeno de alotropía. En efecto, se ha observado que la acción del anhídrido dipropilacético en la base de pirimetamina proporciona un compuesto que funde a 89°C cuando cristaliza a partir del pentano. A esta primera forma alotrópica se le denominará en adelante como "forma W". La existencia de otras formas alotrópicas de la 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina ha sido demostrada por medio de diversos experimentos que dieron los resultados siguientes:
15. (a) la "forma W" (p.f. 89°C), cuando se recristaliza a partir del isooctano proporciona un producto que es químicamente idéntico a la "forma W" pero que tiene un punto de fusión de 113°C.
20. A esta última variedad se le denominará de aquí en adelante
- 25.

417142

- 5 -



"forma X".

(b) La "forma W" cuando se recristaliza a partir del heptano, proporciona la "forma X".

5. (c) La "forma W", cuando se recristaliza a partir del pentano, o del hexano, dá la "forma W".

(d) La "forma X", cuando se recristaliza a partir del hexano, de la "forma W".

10. (e) La "forma W" o la "forma X" cuando se calientan progresivamente hasta los 140°C hasta que se alcanza la licuefacción total, y a continuación se enfría a 100°C, manteniéndose durante 2 horas a esta temperatura, proporciona una nueva forma alotrópica que funde a los 121°C. A esta forma se le denominará a continuación "forma Y".

15. (f) La "forma X", cuando se disuelve hasta la saturación en trementina mineral, dá, después de enfriamiento lento, la "forma Y" con una temperatura de fusión de 121°C.

(g) La "forma W" (p.f. 89°C) y la "forma X" (p.f. 113°C), cuando se funden a 140°C y se enfrían rápidamente proporcionan cada una forma amorfa, con aspecto cristalino, que funde a 20. 59-60°C. A esta forma amorfa se la denominará a continuación "forma Z".

(h) La "forma Y" (p.f. 121°C) y la "forma Z" (p.f. 59-60°C), cuando se recristalizan a partir del hexano o del isooctano, proporcionan la "forma W" y la "forma X", respectivamente.

25. Todas estas variedades son idénticas en cuanto a su



composición química. Sus espectros corresponden exactamente cuando se determinan en soluciones, pero cuando se determinan en los compuestos en forma sólida, existen diferencias.

- Un estudio de estas diversas formas alotrópicas durante el almacenamiento ha revelado lo siguiente:
5. (a) Una lenta evolución de la "forma W" hacia la "forma X", lo que demuestra que la "forma W" no es estable.
- (b) La perfecta estabilidad de la "forma X" en cuanto a su aspecto, color, olor, controles químicos (temperatura de fusión, mediciones de los espectros).
10. (c) La perfecta estabilidad de la "forma Y".

Los otros derivados diacilatados de la pirimetamina no parece que presenten fenómenos de alotropia.

- Los compuestos de la invención, según se ha comprobado, poseen valiosas propiedades farmacológicas. En particular se ha descubierto que los compuestos de la invención poseen una actividad antiprotozoaria que probablemente los haga útiles en el tratamiento de diversas enfermedades tales como, por ejemplo, la malaria, así como propiedades toxoplasmicidas y anti-alérgicas.
- 15.
- 20.

- En cuanto al tratamiento, tanto preventivo como curativo, de la malaria, el agente de más éxito y el más utilizado hasta el momento presente es la pirimetamina. No obstante, en la mayoría de las regiones infestadas por la malaria, se ha abandonado el uso de la pirimetamina debido a los indeseables
- 25.

417142



- 7 -

5. efectos colaterales provocados por esta sustancia cuando se administra a dosis terapéuticas durante periodos prolongados. Estos efectos colaterales puede ser de tipo hematológico llevando, por ejemplo, a afecciones tales como la leucopenia, o tomar la forma de trastornos digestivos o incluso de lesiones renales.

10. Los resultados de las diversas pruebas efectuadas con los compuestos de la invención indican que estos últimos no presentan estas desventajas, mientras que, al mismo tiempo, ejercen un efecto terapéutico que es al menos equivalente al de la pirimetamina.

15. Se realizaron pruebas de toxicidad aguda con compuestos de la invención de acuerdo con la técnica de Litchfield y Wilcoxon (J. Pharmacol., 1949, 95, 99). Las pruebas se realizaron en ratones adultos de la cepa Swiss con peso de 20 a 30 g. Se dividió a los animales en grupos de 50 y se administró el compuesto en estudio, intraperitoneal u oralmente, a grupos sucesivos, de manera que cada grupo recibiera una dosis superior al grupo anterior. La finalidad de esta prueba fué la de establecer la LD₅₀ o dosis mínima requerida para matar el 50% de los animales del experimento. La sustancia de referencia elegida fué la pirimetamina.

20. No obstante, se comprobó que si bien pudo determinarse la LD₅₀ para la pirimetamina, los compuestos de la invención carecían de tal modo de toxicidad que no pudo establecerse en

25.

417142

- 8 -



- absoluto ninguna dosis letal en absoluto. Para los compuestos de la invención, el factor limitador fué la cantidad de producto que los animales eran capaces físicamente de absorber por vías tanto peritoneal como oral. Esta última dosis, que no consiguió matar a ningún animal, se denomina a continuación la máxima dosis tolerada (MDT), es decir, la cantidad máxima de producto que el animal era físicamente capaz de aceptar.
5. Esta dosis también podría denominarse LD_0 , es decir la más alta dosis que pueden recibir todos los animales sin que ocurra ningún fallecimiento. No obstante, a efectos del presente texto utilizaremos la abreviatura MDT.
- 10.

En estas circunstancias, se registraron los siguientes resultados:

- En relación con la pirimetamina, la LD_{50} por vía intraperitoneal fué como media de 74 mg/kg y por vía oral de 128 mg/kg.
- 15.

- Con los dos compuestos preferidos de la invención, a saber, la 2,-dipropilacetamido-4-amino-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (llamada a continuación B 8270), y la 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (llamada a continuación B 8370), se comprobó que la MDT por vía intraperitoneal tanto para la B 8270 como para la B 8370 superaba los 1500 mg/kg. mientras que la MDT por vía oral para ambos compuestos superaba los 3000 mg/kg.
- 20.

- Las mismas MDT se registraron tanto para la B 8270 como para la B 8370 en pruebas de toxicidad con pollos por vía
- 25.



intraperitoneal, mientras que una dosis intraperitoneal de 75 mg/kg de pirimetamina mató el 60% de los pollos.

- En cuanto a la actividad antiprotozoaria, se realizaron primero pruebas en ratones con el fin de determinar su acción contra el Plasmodium Berghei. Se infectó artificialmente a los animales por vía intraperitoneal por medio de una suspensión en una solución isotónica de cloruro sódico de glóbulos rojos portadores de parásitos en número de 5×10^6 , tomados de animales infectados 5 días antes.
- 5.
10. La enfermedad así provocada, se desarrolló del siguiente modo al no ser tratada:
1. Fase pre-hematológica
- Los parásitos aparecieron en la sangre 48 horas después de la inoculación de la suspensión de glóbulos rojos portadores de parásitos. Durante esta fase pre-hematológica, aumentó la actividad de la ribonucleasa del plasma y los parásitos actuaron selectivamente sobre los reticulocitos que se convirtieron a continuación en eritrocitos acidofílicos. Hubo por consiguiente una disminución en el número de reticulocitos en comparación con el nivel inicial.
- 15.
- 20.
2. Fase hematológica
- Durante esta fase, pudieron descubrirse fácilmente los parásitos por medio de extensiones en platina teñidas con Colorante May Grünwald Giemsa o púrpura de cresilo brillante o una mezcla de ambos.
- 25.



El nivel de parásitos en la sangre aumentó hasta que murieron los animales. En este momento, pudo comprobarse que la anemia había llegado hasta un punto en el que el recuento de eritrocitos era de $1,5 \times 10^6$.

5. 3. Fase de desarrollo total de la enfermedad

Esta fase comenzó el sexto día después de la inoculación. Hubo una progresiva pérdida de peso, acompañada de apatía, al mismo tiempo que se les erizó el pelo y las orejas y más tarde los ojos se decoloraban.

10. 4. Fase final

Esta fase comenzaba el octavo día después de la inoculación. Los ratones aparecían totalmente decolorados, las cabezas colgaban entre sus patas delanteras, mientras que arqueaban el lomo. Se negaban a comer y beber y las patas traseras las tenían paralizadas. Aparecía disnea seguida de convulsiones e hipotermia, seguido por la muerte.

15.

A los 15 días todos los animales habían muerto.

20.

En la prueba realizada, se compararon los dos compuestos preferidos de la invención, a saber, la B 8270 y la B 8370 con la pirimetamina.

Se observaron las siguientes condiciones experimentales:

Los ratones fueron divididos en lotes de 10.

25.

A los animales de control se les inoculó la suspensión portadora de parásitos pero no recibieron tratamiento.

En el tratamiento preventivo, el compuesto en estudio

417142



se administró 24 horas después de la inoculación.

En el tratamiento curativo, el compuesto en estudio se administró 4 días después de la inoculación.

5. El desarrollo de la enfermedad se estudió por medio de extensiones teñidas realizadas al día siguiente a la inoculación, y a continuación en una media de cada dos días durante una semana, y posteriormente una vez por semana durante un mínimo de un mes.

10. Los compuestos en estudio se administraron durante 6 días consecutivos.

Los ratones eran considerados libres de los parásitos cuando 50 exámenes microscópicos sucesivos de extensiones habían dado resultados negativos y cuando la inoculación con su sangre no transmitía la enfermedad a ratones sanos.

15. El producto en estudio se consideró activo cuando prolongaba la supervivencia de la mitad de los animales tratados durante al menos 15 días después de la muerte del último animal de control. La dosis que alcanzaba este resultado se denomina a continuación Dosis Efectiva.50 ó ED₅₀. La dosificación de los tres compuestos utilizados en la prueba se calculó de manera que contuvieran una cantidad equimolecular de la pirimetamina base.

20.

Los resultados obtenidos en estas pruebas se dan en las siguientes Tablas I, II, III y IV.

417142

TABLA I

Tratamiento preventivo por vía intraperitoneal

Número de días después de la inoculación	Controles		Pirimetamina (base)						B 8270						B 8370					
	I	D	0.25 mg/kg		0.50 mg/kg		0.37 mg/kg		0.75 mg/kg		0.50 mg/kg		1 mg/kg		1 mg/kg					
			I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D				
5	7/10	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
7	7/7	3/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
8	4/4	6/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
9	3/3	7/10	0	0	0	0	3/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
10	3/3	7/10	0	0	0	0	0	7/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
13		10/10	3/10	1/10	0	0	5/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
16			3/9	1/10	0	0	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
19			4/8	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
22			6/8	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
27			8/8	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
30			8/8	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
36			8/8	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
40			8/8	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

I = Infectados

D = Fallecidos

Dosis equimolecular de pirimetamina base

B 8270 0.37 = 0.25 mg/kg; 0.75 = 0.50 mg/kg.

B 8370 0.50 = 0.25 mg/kg; 1 mg = 0.50 mg/kg.



417142

417142

TABLA I

Tratamiento preventivo por vía int.

Número de días después de la inoculación	Controles		Pirimetamina (base)				
	I	D	0.25 mg/kg		0.50 mg/kg		0.37 mg
			I	D	I	D	I
5	7/10	0/10	0	0	0	0	0
7	7/7	3/10	0	0	0	0	0
8	4/4	6/10	0	0	0	0	0
9	3/3	7/10	0	0	0	0	3/10
10	3/3	7/10	0	0	0	0	7/10
13		10/10	3/10	1/10	0	0	5/10
16			3/9	1/10	0	0	2/10
19			4/8	2/10	0	0	0
22			6/8	2/10	0	0	0
27			8/8	2/10	0	0	0
30			8/8	2/10	0	0	0
36			8/8	2/10	0	0	0
40			8/8	2/10	0	0	0

I = Infectados

D = Fallecidos

417142



417142

TABLA II

Tratamiento curativo por vía intraperitoneal

Número de días después de la inoculación	Controles		Pirimetamina (base)						B 8270						B 8370					
	I	D	0.25 mg/kg		0.50 mg/kg		0.37 mg/kg		0.75 mg/kg		1.50 mg/kg		1 mg/kg		0.50 mg/kg		1 mg/kg			
			I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D		
5	10/10	0	10/10	0	10/10	0	10/10	0	10/10	0	10/10	0	10/10	0	10/10	0	10/10	0		
8	7/7	3/10	7/10	0	6/10	0	8/10	0	7/10	0	6/10	0	7/10	0	6/10	0	3/10	0		
10	6/6	4/10	7/10	0	1/10	0	8/10	0	6/10	0	1/10	0	6/10	0	1/10	0	0	0		
15		10/10	7/9	1/10	0	8/10	0	3/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
18			5/7	3/10	0	7/8	2/10	2/10	0	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0		
22			5/7	3/10	0	7/8	2/10	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
27			3/6	4/10	0	6/7	3/10	3/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
30			3/6	4/10	0	6/6	4/10	4/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
31			3/4	6/10	0	5/6	4/10	4/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
32			1/3	7/10	0	3/5	5/10	5/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
38			1/3	7/10	0	3/5	5/10	5/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
40			1/3	7/10	0	3/5	5/10	5/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Dosis equimolecular de pirimetamina base: igual a en la tabla I.

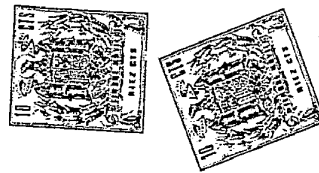
417142

TABLA II

Tratamiento curativo por vía intraperi

Número de días después de la inoculación	Controles		Pirimetamina (base)				B	
	I	D	0.25 mg/kg		0.50 mg/kg		0.37 mg/	
			I	D	I	D	I	
5	10/10	0	10/10	0	10/10	0	10/10	
8	7/7	3/10	7/10	0	6/10	0	8/10	
10	6/6	4/10	7/10	0	1/10	0	8/10	
15		10/10	7/9	1/10	0	0	8/10	
18			5/7	3/10	0	0	7/8	2,
22			5/7	3/10	0	0	7/8	2,
27			3/6	4/10	0	0	6/7	3,
30			3/6	4/10	0	0	6/6	4,
31			3/4	6/10	0	0	5/6	4,
32			1/3	7/10	0	0	3/5	5,
38			1/3	7/10	0	0	3/5	5,
40			1/3	7/10	0	0	3/5	5,

Dosis equimolecular de pirimetamina base: igual se en la f



vía intraperitoneal

417142

e)	B 8270				B 8370			
	0.37 mg/kg		0.75 mg/kg.		0.50 mg/kg.		1 mg/kg.	
D	I	D	I	D	I	D	I	D
0	10/10	0	10/10	0	10/10	0	10/10	0
0	8/10	0	7/10	0	6/10	0	3/10	0
0	8/10	0	6/10	0	1/10	0	0	0
0	8/10	0	3/10	0	0	0	0	0
0	7/8	2/10	1/10	0	0	0	0	0
0	7/8	2/10	0	0	0	0	0	0
0	6/7	3/10	0	0	0	0	0	0
0	6/6	4/10	0	0	0	0	0	0
0	5/6	4/10	0	0	0	0	0	0
0	3/5	5/10	0	0	0	0	0	0
0	3/5	5/10	0	0	0	0	0	0
0	3/5	5/10	0	0	0	0	0	0

al se en la Tabla I.

417142

TABLA III

Tratamiento preventivo por vía oral

Número de días después de la inoculación	Controles		Pirimetamina (base)				B 8270						B 8370					
	I	D	1 mg/kg.		2.5 mg/kg.		1.5 mg/kg.		3.75 mg/kg.		2 mg/kg.		5 mg/kg.		I	D	I	D
			I	D	I	D	I	D	I	D	I	D						
3	10/10	0	2/10	0	0	0	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	10/10	0	2/10	0	0	0	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	8/9	1/10	2/10	0	0	0	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	3/3	7/10	1/9	1/10	0	0	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12		10/10	1/9	1/10	0	0	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20			1/9	1/10	0	0	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55			0	2/10	0	0	0	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60			0	2/10	0	0	0	2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Intraperitoneal B 8270 1,5 = 1 mg/kg; 4,75 = 2,5 mg/kg de pirimetamina base
 Oral B 8370 2 = 1 mg/kg; 5 = 2,5 mg/kg de pirimetamina base

417142



417142

TABLA III

Tratamiento preventivo por vía oral

Número de días después de la inoculación	Controles		Pirimetamina (base)				1.5 mg/kg
	I	D	1 mg/kg.		2.5 mg/kg		
			I	D	I	D	
3	10/10	0	2/10	0	0	0	1/10
8	10/10	0	2/10	0	0	0	2/10
10	9/9	1/10	2/10	0	0	0	2/10
11	3/3	7/10	1/9	1/10	0	0	2/10
12		10/10	1/9	1/10	0	0	2/10
20			1/9	1/10	0	0	2/10
55			0	2/10	0	0	0
60			0	2/10	0	0	0

Intraperitoneal B 8270 1,5 = 1 mg/kg; 4,75 = 2,5 mg/kg de
 Oral B 8370 2 = 1 mg/kg; 5 = 2,5 mg/kg de



417142

B 8270				B 8370			
1.5 mg/kg.		3.75 mg/kg.		2 mg/kg.		5 mg/kg.	
I	D	I	D	I	D	I	D
1/10	0	0	0	0	0	0	0
2/10	0	0	0	0	0	0	0
2/10	0	0	0	0	0	0	0
2/10	0	0	0	0	0	0	0
2/10	0	0	0	0	0	0	0
2/10	0	0	0	0	0	0	0
0	2/10	0	0	0	0	0	0
0	2/10	0	0	0	0	0	0

g/kg de pirimetamina base

g/kg de pirimetamina base



417142

TABLA IV

Tratamiento curativo por vía oral

Número de hías des- pués de la inocula- ción	Controles		Pirimetamina (base)						B 8270						B 8370							
	I	D	1 mg/kg.		2.5 mg/kg.		1.5 mg/kg.		3.75 mg/kg.		2 mg/kg.		5 mg/kg.		I	D	I	D	I	D	I	D
			I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D								
8	4/4	6/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1/1	9/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11		10/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21			0	0	0	0	0	0	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22			0	0	0	0	0	0	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27			1/7	3/10	0	0	0	5/7	3/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33			1/7	3/10	0	0	4/5	5/10	5/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47			2/6	4/10	0	0	3/5	5/10	5/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57			2/6	6/10	0	0	5/5	5/10	5/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

417142



Dosis equimolecular de pirimetamina base: igual te en la Tabla III.

417142

TABLA IV

Tratamiento curativo por vía oral

Número de días después de la inoculación	Controles		Pirimetamina (base)						B
	I	D	1 mg/kg.		2.5 mg/kg.		1.5 mg/kg.		
			I	D	I	D	I	D	
8	4/4	6/10	0	0	0	0	0	0	
9	1/1	9/10	0	0	0	0	0	0	
11		10/10	0	0	0	0	0	0	
21			0	0	0	0	0	0	
22			0	0	0	1/10	0		1
27			1/7	3/10	0	1/10	5/7		3
33			1/7	3/10	0	1/10	4/5		5
47			2/6	4/10	0	1/10	3/5		5
57			2/6	6/10	0	1/10	0/5		5

Dosis equimolecular de pirimetamina base: igual se en la

via oral



417142

B 8270				B 8370			
1.5 mg/kg.		3.75 mg/kg.		2 mg/kg.		5 mg/kg.	
I	D	I	D	I	D	I	D
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	1/10	0	0	0	0	0	0
10	0	1/10	0	0	0	0	0
10	5/7	3/10	0	0	2/10	0	0
10	4/5	5/10	0	0	1/9	1/10	0
10	3/5	5/10	0	0	0	2/10	0
10	0/5	5/10	0	0	0	2/10	0

igual se en la Tabla III.



Basándose en los resultados así obtenidos, puede determinarse el Índice de Actividad de cada compuesto estudiado. El Índice de Actividad se calcula dividiendo la LD₅₀ (o, en el caso de los compuestos de la invención, la MDT dado que los compuestos son tan poco tóxicos que no puede determinarse la LD₅₀) por la ED₅₀ o Dosis Efectiva 50, es decir,

$$\frac{LD_{50} \text{ (o MDT)}}{ED_{50}}$$

10. Los resultados comparativos según este cálculo son los siguientes:

	<u>Intraperitoneal</u>	<u>Oral</u>
Pirimetamina	$\frac{74}{0.50} = 148$	$\frac{128}{1} = 128$
B 8270	$> \frac{1500}{1} = > 1500$	$> \frac{3000}{1} = > 3000$
15. B 8370	$> \frac{1500}{1} = > 3000$	$> \frac{3000}{1} = > 2000$

20. Estas cifras muestran que la ED₅₀ de los tres compuestos citados son similares entre sí, con una ligera ventaja en favor de la B 8270. No obstante, los Índices de Actividad son netamente favorables a la B 8270 y a la B 8370 debido a la toxicidad excepcionalmente baja de estos últimos compuestos.

Se efectuó otra serie de pruebas antiprotozoarias para determinar la actividad de los compuestos de la invención contra el Plasmodium Gallineaceum.

25. En estas pruebas se provocó la enfermedad experimental en pollitos de 15 días por inyección intramuscular de sangre

417142



de un pollo en el momento más crítico de la infección (décimo día).

5. A partir del décimo/duodécimo día después de la inyección murió del 40% al 50% de los pollitos, después de lo cual descendió la concentración de parásitos en la sangre de los supervivientes. Entre el día veinticinco y el treinta hay un nuevo ataque fatal. Finalmente, supervivieron alrededor del 30% de los pollitos infectados con los parásitos.

10. El tratamiento se administró por vía intraperitoneal en un periodo de 8 días consecutivos.

15. Como en las pruebas anteriores, los animales fueron divididos en lotes de 10 utilizándose la pirimetamina como producto de referencia. Los resultados se evaluaron por el nivel del parásito en la sangre y por el número de fallecimientos.

En las pruebas preventivas, el compuesto en estudio y la pirimetamina se inyectaron 2 días después de la administración de la dosis infectiva.

20. En las pruebas curativas, las inyecciones se administraron 7 días después de la administración de la dosis infectiva. En esta última prueba, todos los pollos tratados y los controles supervivientes fueron infectados de nuevo con una inyección intramuscular nueva del Plasmodium a los veintisiete días, evaluándose de nuevo los resultados, esta vez a los once días, en términos de nivel del parásito en la sangre y de número de fallecimientos.

25.

417142



En las tablas siguientes se dan los resultados obtenidos con la pirimetamina y con la B 8370:

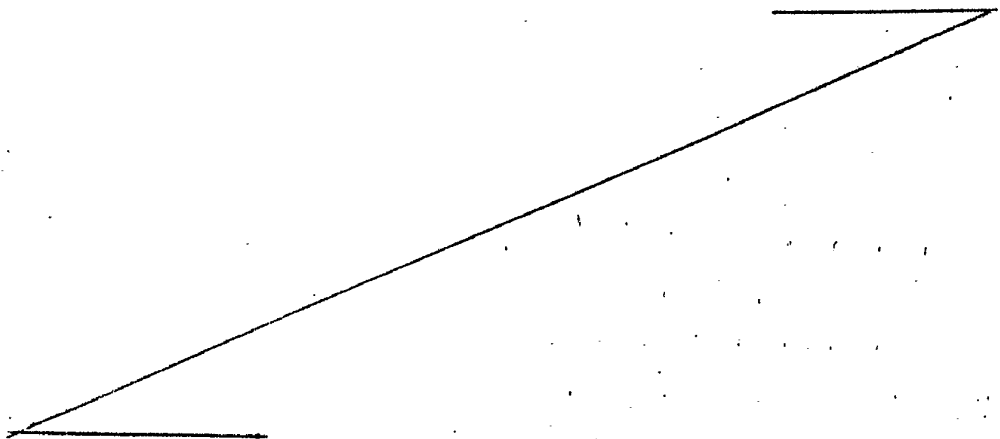
Tratamiento preventivo

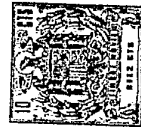
5.

	Controles	Pirimetamina		B 8370	
		0,25 mg/ kg.	0,50 mg/ kg.	0,25 mg/ kg.	0,50 mg/ kg.
10.	Nivel de parásitos en la sangre	10/10 siete días después de la infección	0 después de 20 días	0 después de 20 días	0 después de 20 días
15.	Fallecimientos	6/10 a los quince días - 6/10 a los veintiocho días	0 después de 28 días	0 después de 28 días	0 después de 28 días

20.

25.





Tratamiento curativo

	Controles	Pirimetamina		B 8370	
		0,50 mg/ kg.	2,5 mg/ kg.	1 mg/ kg.	5 mg/ kg.
5.	10/10 a los siete días	10/10 después de 7 días	10/10 después de 7 días	10/10 después de 7 días	10/10 después de 7 días
10.		0/10 después de 15 días	0/10 después de 15 días	0/10 después de 15 días	0/10 después de 15 días
		10/10 después de 22 días	0/10 después de 22 días	0/10 después de 22 días	0/10 después de 22 días
15.		10/10 después de 27 días	10/10 después de 27 días	10/10 después de 27 días	0/10 después de 27 días
	Fallecimientos	4/10 a los veintisiete días	0 a los 27 días	0 a los 27 días	0 a los 27 días

20.

REINFECCION

25.	Fallecimientos	6/6 a los once días después de la infección	8/10 a los 11 días (Parasitemia en los supervivientes)	8/10 a los 11 días (Parasitemia en los supervivientes)	6/10 a los 11 días (Ninguna parasitemia en los supervivientes)	3/10 a los 11 días (Ninguna parasitemia en los supervivientes)
-----	----------------	---	--	--	--	--

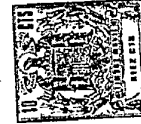
417142



- Las mismas conclusiones pueden extraerse como se hizo en las pruebas de los ratones anteriormente descritas. La B 8370 a una dosis de 5 mg/kg en tratamiento curativo es más activa que la pirimetamina base en una dosis equimolar. A los veintisiete días ningún pollito mostraba parasitemia, mientras que con la pirimetamina base todos ellos habían vuelto a caer en la infección. Si se tienen además en cuenta los valores de la toxicidad relativa, la superioridad de la B 8370 es aún más marcada.
- 5.
10. Actividad antitoxoplásmica
- Los fármacos que se emplean normalmente para el tratamiento de la toxoplasmosis son la pirimetamina, que es un agente muy activo para esta condición, y algunas sulfonamidas, tales como la sulfapirazina. Como hemos indicado anteriormente, el uso de la pirimetamina durante periodos prolongados supone el riesgo de efectos colaterales indeseables. El uso de las sulfonamidas puede ir también acompañado por efectos colaterales que lleguen incluso a lesiones renales.
- 15.
- Por consiguiente, es muy conveniente que se desarrolle un agente distinto que, al mismo tiempo que posea una positiva acción antitoxoplásmica, no presente el inconveniente de producir efectos colaterales cuando se administre durante periodos prolongados de tiempo.
- 20.
- Los compuestos de la invención son posiblemente capaces de proporcionar ese agente de sustitución porque están dotados de marcadas propiedades antitoxoplásmicas.
- 25.

417142

- 21 -



Esta actividad antitoxoplásmica se puso de relieve en pruebas realizadas con ratones infectados con Toxoplasma Gondii (Cepa Sabin Rh). Se inoculó intraperitonealmente a ratones sanos con 0,25 ml de una suspensión de ascitis tomada de un ratón inoculado tres días antes.

Si no es tratada, la enfermedad en estas condiciones se desarrolla como sigue:

5.

O bién:

(a) El animal pierde peso rápidamente (un 25%), tomando la piel un tono mate, con los pelos erizados y apareciendo disnea. Al cuarto día, el animal aparece adinámico y agotado. Ni come ni bebe ya. La muerte suele ocurrir el quinto día en condiciones de completo agotamiento.

10.

O bién:

(b) El animal conserva su aspecto normal, aunque con una ligera adinamia, y al día siguiente a la inoculación presenta una abundante ascitis rica en toxoplasma. El quinto día, la respiración comienza a hacerse difícil, pero no se presenta una marcada emaciación. Hacia el sexto día la piel se decolora y el animal no se alimenta ya. La muerte ocurre entre el sexto y séptimo días.

15.

20.

Como en pruebas anteriores, los compuestos de la invención fueron comparados con la pirimetamina base como producto de referencia. Todos los productos se administraron por vía oral dos días antes de la inoculación con el parásito y a continuación todos los días hasta terminar el experimento (cuaren-

25.

417142

- 22 -



- ta y cinco días). Las dosis utilizadas fueron una quinta parte de la LD₅₀ para la pirimetamina y una sexta parte de la MDT para los compuestos de la invención. Se eligieron estas dosis porque se comprobó que dosis menores eran inactivas en las condiciones experimentales empleadas. Los ratones utilizados eran de la cepa Swiss y se dividieron en lotes de 25.

La tabla siguiente dá los resultados obtenidos con la pirimetamina y la B 8370.

10.	Nº de días después de la inoculación del parásito	Controles	Pirimetamina base 25 mg/kg	B 8370 500 mg/kg
	4	5/25	0	0
	5	16/25	0	0
	6	25/25	1/25	0
15.	8		4/25	0
	11		8/25	0
	13		9/25	0
	15		10/25	0
	17		10/25	0
20.	19		13/25	0
	20		14/25	0
	22		15/25	0
	23		15/25	0
	35		15/25	0
	41		15/25	0
25.	45		15/25	0

417142

- 23 -



Estos resultados demuestran que, mientras que todos los animales de control habían muerto al sexto día y el 60% de los animales tratados con pirimetamina habían muerto al terminar el experimento, todos los ratones tratados con B 8370 sobrevivieron.

5.

Actividad antialérgica

Se comparó la actividad antialérgica de los compuestos de la invención con la de la pirimetamina base por la prueba clásica del edema pulmonar producido por ovalbúmina en el cobayo.

10.

Se utilizaron cuatro lotes de 8 cobayos albinos machos que pesaban aproximadamente 300 g, adoptándose el procedimiento siguiente:

15.

Lote nº 1 : Este fué el lote de control. A cada animal se le administró diariamente una dosis intraperitoneal de 0,2 ml de una solución isotónica de cloruro de sodio durante un periodo de 15 días con el fin de colocarlos en las mismas condiciones "psicológicas" que los animales tratados.

20.

Lote nº 2 : Cada animal de este lote recibió una dosis diaria intraperitoneal de 0,5 mg/kg de pirimetamina base durante un periodo de 15 días.

25.

Lote nº 3 : Cada animal recibió una dosis diaria intraperitoneal de 0,75 mg/kg de B 8270 durante un periodo de 15 días.

Lote nº 4 : Cada animal recibió una dosis diaria intraperitoneal de 1 mg/kg de B 8270 durante un periodo de 15 días.



El primero y el segundo días después de la administración de la dosis indicadas, se sensibilizó cada lote por medio de una inyección intraperitoneal de 0,2 ml de una solución acuosa al 2% de ovalbúmina por 300 g de peso corporal.

5.

Se produjo el shock el quinto día por una inyección intracardíaca de 0,1 mg de la misma solución de ovalbúmina por 300 g de peso corporal.

En la tabla siguiente se dan los resultados obtenidos:

10.

Lote	Número de animales expuestos a la prueba	Número de animales que sufrieron un shock fatal
Controles	8	8
15. Pirimetamina base	6 (2 murieron durante el periodo de sensibilización)	3
B 8270	7 (1 murió durante el periodo de sensibilización)	2
20. B 8370	8	2

Estas cifras demuestran que los compuestos de la invención poseen un grado superior de actividad antialérgica que la pirimetamina.

25.

417142

- 25 -



5. Se comprenderá que, para uso terapéutico, los compuestos de la invención deberán administrarse normalmente en forma de una composición farmacéutica o veterinaria, que puede ser en forma de dosis unitaria apropiada al modo deseado de administración, por ejemplo, una tableta recubierta o no recubierta, un polvo, una cápsula o un jarabe conteniendo de 100 a 500 mg de sustancia activa para administración oral o un supositorio para administración rectal.

10. Independientemente de la forma que tome la composición, la composición farmacéutica o veterinaria incluirá normalmente al menos un compuesto de la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un portador o vehículo farmacéutico para el mismo. El vehículo puede ser un diluyente o excipiente del tipo que se emplean normalmente en la producción de medicamentos dispuestos para su uso como, por ejemplo, al menos un ingrediente tomado entre las sustancias siguientes: talco, estearato de magnesio, lactosa, sacarosa, carboximetilcelulosa, almidones, caolín, levulita, manteca de coco.

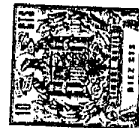
20. Los Ejemplos siguientes ilustran la invención:

EJEMPLO 1

Preparación de 2-dipropilacetamido-4-amino-5-p-clorofenil-5-etil-pirimidina

25. Se colocaron 149 g de pirimetamina y 500 g de piridina en un matraz de un litro. Se calentó la mezcla hasta

417142



95°C, obteniéndose una solución homogénea y, a la misma temperatura, se añadieron 40,5 g de cloruro de dipropilacetilo.

- La adición duró unos 45 minutos, después de lo cual, se mantuvo el medio de reacción a 95°C durante una hora.
5. Se enfrió la mezcla así obtenida a 20°C y se filtró el precipitado de hidroccloruro de pirimetamina. Se recogieron los filtrados y se calentaron a 60°C a una presión de 25 mm Hg obteniéndose un producto aceitoso. Se retiró este aceite bajo reflujo en 200 g de etanol y se introdujo la solución
10. así obtenida en una mezcla de 200 g de etanol y 250 g de agua desmineralizada. La solución se dejó estar durante 12 horas a 0°C, y el precipitado que se formó se lavó primero con 250 g de solución de ácido acético al 10% y acto seguido con agua desmineralizada hasta la neutralización. Se secó el precipitado en vacío en una estufa a 70°C a peso constante
15. (aproximadamente 12 horas). De esta forma se obtuvieron 43,5 g de producto crudo que representa una producción del 46,5% en relación con la pirimetamina de partida. Este producto crudo se disolvió mientras se sometía a agitación y reflujo, en
20. una mezcla de 280 g de heptano y 40 g de tolueno, en presencia de 4,5 g de carbón activado. Se mantuvo la mezcla bajo reflujo durante 30 minutos y a continuación se retiró el carbón por filtración. Se enfrió el filtrado a -10°C, durante 4 horas y se filtró el precipitado que se obtuvo sobre vidrio
25. poroso y se secó en vacío en una estufa de secado a 60°C a pe-



- so constante. Después de la primera purificación, se obtuvieron 34 g del producto deseado retirándose bajo reflujo en 240 g de etanol en presencia de 1,5 g de carbón activado. Se filtró el carbón y se concentró el filtrado en vacío a aprox. 100 ml y se enfrió a 0°C durante 12 horas. El precipitado así obtenido se filtró, se enjuagó con 10 g de etanol helado y a continuación se secó en vacío en una estufa de secado a 60°C a peso constante. Por este procedimiento, se obtuvieron 31,5 g de 2-dipropilacetamido-4-amino-5-p-clorofenil-6-etilpirimidina, con 172°C de temperatura de fusión, representando una producción del 73%.

EJEMPLO 2

Preparación de 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etilpirimidina

15. Forma X

En un matraz de dos cuellos y de 250 ml dotado con un condensador y un agitador mecánico, se introdujeron 47,6 g (0,19 mol) de pirimetamina y 121,6 g (0,45 mol) de anhídrido dipropilacético. Se calentó la mezcla mientras se agitaba vigorosamente a 150°C. durante tres horas y media. El ácido dipropilacético que se formó, así como el anhídrido dipropilacético en exceso se destilaron en vacío (0,2 mm Hg). De esta manera se obtuvieron 58 g de una mezcla que destiló a 90-94°C bajo 0,2 mm Hg. Se extrajo el residuo caliente en 200 ml de heptano. La solución fué entonces colocada durante unas 10



horas en un frigorífico y se centrifugaron los cristales así obtenidos lavándolos dos veces con heptano helado. Después de secado, se obtuvieron 82,6 g de 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina pura (forma X), p.f. 113-114°C representando una producción del 87%.

5.

La base libre obtenida de esta manera se convirtió respectivamente en su hidrocioruro, su axalato y su dimetano-sulfonato tal como más adelante se describe.

Monohidrocioruro

10.

A una solución etérica de 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (forma X) se añadió una solución de ácido clorhídrico en éter (1 mol de la base libre de 1 mol de ácido clorhídrico). El monohidrocioruro de 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (forma X) así formado tenía un p.f. de 119-121°C cuando se cristalizó a partir de éter isopropílico.

15.

Monooxalato

A una solución etérica de la base libre anteriormente obtenida se añadió una solución de ácido oxálico en éter (1 mol de base libre a 1 mol de ácido oxálico). Entonces se cristalizó el monooxalato de 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (forma X) así formado, a partir de isopropanol.

20.

Dimetanosulfonato

25.

A una solución etérica de base libre previamente

417142

- 29 -



obtenida se añadió ácido metanosulfónico. El dimetanosulfonato de 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (forma X) así formado tenía un p.f. de 84,5°C cuando se cristalizó a partir del éter de isopropilo.

5.

Forma W

Se preparó 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (forma W) con el mismo procedimiento descrito para la "forma X" pero con pentano en vez de heptano como disolvente. El producto tenía p.f. de 89°C.

10.

Forma Y

Se calentaron progresivamente hasta 140°C en termen-tina mineral 5 g de 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (forma W o X). Por enfriamiento lento, se obtuvieron 2 g de 2,4-bis-dipropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina (forma Y), p.f. 121°C, representando una producción del 40%

15.

EJEMPLO 3

Preparación de dimetanosulfonato de 2,4-bis-(2-etil-2-butil-acetamido)5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina

20.

En un matraz de dos cuellos y 100 ml dotado con un condensador y agitador mecánico, se introdujeron 12,5 g (0,05 mol) de pirimetamina y 29,7 g de (0,11 mol) anhídrido 2-etil-hexanoico. Se calentó la mezcla durante tres horas y media a 150°C después de lo cual se destilaron el ácido 2-etil-hexanoico que se formó y el anhídrido etil-hexanoico en exceso, en va-

25.



5. El residuo aceitoso se disolvió en 100 ml de hexano y la solución se colocó en un frigorífico. Los cristales formados, que eran casi puros, fueron a continuación centrifugados, lavados y secados. De esta forma se obtuvieron 18 g (producción: 72%) del producto deseado, siendo entonces re-cristalizado el producto primero a partir de 70 ml de pentano y a continuación a partir de 30 ml de hexano.

10. Con este procedimiento, se obtuvieron 8,5 g de 2,4-bis-(2-etil-2-butil-acetamido)-5-p-etil-pirimidina pura en forma de base libre, representando una producción del 34%, después de purificación. El producto tenía una temperatura de fusión de 48,4°C.

15. Se disolvieron 250 mg de la base libre anteriormente obtenida en 1 ml de hexano. Esta solución se añadió a 120 mg de ácido metanosulfónico disuelto en 1 ml de éter. El aceite así obtenido se extrajo varias veces en hexano. A continuación se añadieron a la solución 10 ml de éter y se precipitaron unos cristales que fueron centrifugados y secados.

20. Con este método se obtuvieron 300 mg de dimetanosulfonato de 2,4-bis-(2-etil-2-butil-acetamido)-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina, p.f. 73,3°C.

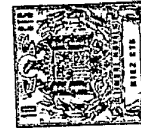
EJEMPLO 4

Preparación de 2,4-bis-tripropilacetamido-5-p-clorofenil-5-etil-pirimidina

25. En un matraz de 50 ml y dos cuellos dotado de condensador y un agitador mecánico se introdujeron 2,25 g (0,009

417142

- 31 -



- mol) de pirimetamina y 7,25 g (0,0204 mol) de anhídrido tripropilacético. La mezcla se calentó entonces a 170°C durante 24 horas. Después de enfriamiento, el aceite así obtenido fue cromatografiado en una columna de alúmina y se eluyó dos veces con 250 ml de éter conteniendo cloroformo al 2%. Los disolventes fueron destilados en vacío y se obtuvo un aceite marrón que cristalizó lentamente a partir del pentano. Los cristales formados fueron centrifugados y recristalizados a partir de 15 ml de hexano. Con este procedimiento, se obtuvo
5. 1,10 g de 2,4-bis-tripropilacetamido-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina pura, con una producción del 21%. El producto tenía una temperatura de fusión de 117,4°C.
- 10.

N O T A

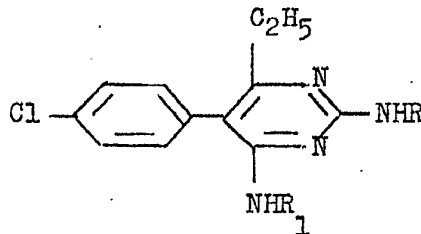
15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Inglaterra, con fecha 21 de Julio de 1972, bajo el número 34.378/72; acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS DE LA PIRUMIDINA;
- 20.
- 25.



caracterizándose por lo siguiente:

1.- Procedimiento para la obtención de derivados de la pirimidina, de fórmula general:

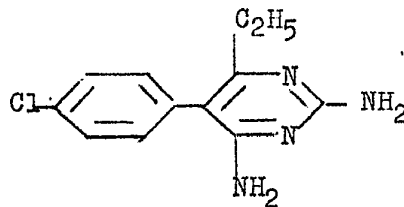
5.



I

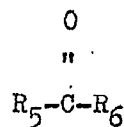
10. y de las sales ácidas de adición simples (mono) y dobles (di), farmacéuticamente aceptables, de estos derivados, en donde R representa un grupo dipropilacetilo, tripropilacetilo, 2-etil-butil-acetilo o 2-metil-2-pentil-acetilo y R₁ representa hidrógeno o un grupo dipropilacetilo, tripropilacetilo, 2-etil-2-butil-acetilo o 2-metil-pentil-acetilo, caracterizado por-
15. que se calienta la 2,4-diamino-5-p-clorofenil-6-etil-pirimidina, de fórmula

20.



con la cantidad adecuada de un compuesto de fórmula general:

25.



II



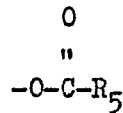
417142

- 33 -



donde R_5 representa un grupo 2-heptilo, 3-heptilo, 4-heptilo o 4-(4-propil)-heptilo y R_6 representa un átomo de cloro o bien

5.



donde R_5 tiene el mismo significado que el fórmula II, para formar los derivados necesarios mono- o di-sustituídos de la fórmula I en forma de base libre que, si se desea, puede hacerse reaccionar con una cantidad estequiométrica de un ácido orgánico o inorgánico para formar una sal ácida de adición simple o doble, farmacéuticamente aceptable.

10.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el calentamiento se efectúa en ausencia de disolvente.

15.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el calentamiento se efectúa en un disolvente, tal como la piridina.

20.

4.- Procedimiento según las cláusulas 1 a 3, caracterizado porque el calentamiento se efectúa en presencia de una fuerte base alifática terciaria como la trimetilamina o la piridina,

25.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido orgánico es ácido oxálico o ácido metanosulfónico, y el ácido inorgánico es ácido clorhídrico.

417142

21



- 34 -

co.

6.- Procedimiento para la obtención de derivados de la pirimidina, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

5. Esta Memoria consta de 34 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

21 JUL. 1973
LABAZ.-

X GOMEZ ACEBO Y MONTERO
p. p. Firmados L. Gaceta Fernández