

434641

REF.: 73 198 GO/bo

Int. Cl.² C07D/A61K

NUMERO 434.641

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un^a

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: SOCIETA ITALO-BRITANNICA L. MANETTI - H.
ROBERTS & C.

RESIDENCIA: 1 Via Carlo Pisacane, 50134 FIRENZE,

Italia.-

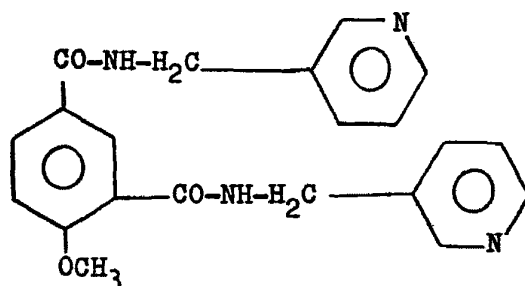
ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE

N, N'- bis-(3-picolil)-4-metoxi-isoftalamida.

Prioridad: Patente n.º del

1 Esta invención se refiere a un agente que inhibe la
agregación de las plaquetas de la sangre y a un procedimien-
to para su preparación. El inhibidor es una picolilamida del
5 ácido 4-metoxi-isoftálico y, más exactamente, un compuesto
al que es aplicable la denominación química de N,N'-bis(3-
picolil)-4-metoxi-isoftalamida.

El compuesto corresponde a la siguiente fórmula estruc-
tural:



Fórmula empírica: $C_{21}H_{20}N_4O_3$

Peso molecular : 376,4

El compuesto se presenta como un polvo blanco, cris-
talino, estable, que es fácilmente cristalizable en benceno.
Su punto de fusión es $124^{\circ}C$.

20 Con fines puramente ilustrativos y en modo alguno li-
mitativos, describiremos ahora dos ejemplos de la prepara-
ción de la N,N'-bis(3-picolil)-4-metoxi-isoftalamida a par-
tir del ácido 4-metoxi-isoftálico.

25 En estos ejemplos, pueden utilizarse las siguientes can-
tidades de sustancias reaccionantes:

dicloruro de ácido 4-metoxi-isoftá- lico (peso molecular 233,061)	0,02 moles	4,7 g
3-aminometilpiridina (peso molecu- lar 108,146)	0,044 moles	4,75 g
triethylamina (peso molecular 101,19)	0,044 moles	4,44 g

30

1 Método A

5 En un matraz de 3 bocas y 250 ml de capacidad, provisto de agitador, refrigerante a reflujo con un tubo protector de gel de sílice y embudo separador, se introducen 4,7 g (0,02 moles) de dicloruro de ácido 4-metoxi-isoftálico, disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano; después se añaden 4,75 g (0,044 moles) de 3-aminometilpiridina (3-picolilamina) disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano: por lo tanto, hay un ligero exceso de la base con respecto al cloruro de ácido. A la suspensión que se ha formado en el matraz se añaden gota a gota, a través del embudo separador, 4,44 g (0,044 moles) de trietilamina disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano. Una vez completada esta adición, la mezcla se calienta a reflujo durante 20 horas con agitación continua. El exceso de tetrahidrofurano se destila a vacío. El residuo se recoge con un exceso de una solución acuosa saturada de NaHCO_3 , se filtra y el residuo sólido se lava con agua y se cristaliza en etanol y se recristaliza en benceno. Su punto de fusión es 124°C .

20 Método B

25 En un matraz de 3 bocas y 250 ml de capacidad, provisto de agitador, refrigerante a reflujo con un tubo protector de gel de sílice y embudo de separación, se introducen 9,5 g de 3-picolilamina disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano. A esta solución se añaden gota a gota, a través del embudo separador, 4,7 g (0,02 moles) de dicloruro de ácido 4-metoxi-isoftálico disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano. Una vez completada esta adición, la mezcla se calienta a reflujo durante 16 horas con agitación continua. Terminada la reacción, el contenido del matraz se vierte en un exceso de una solución acuosa saturada de NaHCO_3 . Cuando ha transcurrido un cierto

30

1 tiempo, se separa un producto cristalino que sucesivamente se filtra y se cristaliza en benceno. Su punto de fusión es 124°C.

Análisis para $C_{21}H_{20}N_4O_3$:

5 Encontrado : C, 67,19; H, 6,14; N, 14,68

Calculado : C, 67,01; H, 5,36; N, 14,88.

Se ha encontrado que la N,N'-bis(3-picolil)-4- etoxi-
isoftalamida presenta una marcada actividad contra la agre-
gación de las plaquetas de la sangre y, por lo tanto, es
10 útil en el campo farmacológico y terapéutico. Esta actividad ha sido ensayada in vitro e in vivo mediante el agregómetro de Born, aparato que permite determinar el grado de inhibición ejercido sobre la tendencia a la agregación de las plaquetas de la sangre.

15 1) Actividad inhibidora de la agregación, in vitro

Unos conejos, que habían sido mantenidos en ayunas desde 12 horas antes con agua a placer, fueron anestesiados con 20 % de etiluretano que fué inyectado en los mismos por vía intraperitoneal a una dosis de 0,6 ml/100 g de peso corporal.
20 La sangre se saca de la arteria carótida y se recoge en citrato sódico al 3,8 % en una proporción de 9:1, y sucesivamente se centrifuga durante 15 minutos a 1000 rpm: se obtiene un plasma rico en plaquetas de la sangre que será llamado PRP en lo que sigue.

25 Parte de este plasma se centrifuga durante 10 minutos más a 8000 rpm, con lo que se obtiene un plasma pobre en plaquetas de la sangre (que será denominado PPP en lo que sigue).

30 La N,N'-bis(3-picolil)-4-metoxi-isoftalamida, disuelta en solución 1N de HCl (o en una solución estequiométrica de ácido fumárico) y regulada con fosfatos a pH 7,4, se agrega

1 a diversas concentraciones al PRP en la relación de 0,1:1,0
de plasma y se incubaba en un baño de agua a 37°C durante 30
minutos. En la cubeta del agregómetro de Born se colocan
5 1,0 ml del PRP así tratado (posición 0 para PPP) y la agrega-
ción de las plaquetas de la sangre es producida por una con-
centración 10⁻²M de la sal disódica de ADP.

La actividad se calcula como la inhibición de la curva
de agregación obtenida con el mismo plasma de control (incu-
bado en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos después de
10 la adición de 0,1 ml de solución salina fisiológica por ml
de plasma). El valor del control se hace igual a 100.

2) Actividad inhibidora de la agregación in vivo

15 Unos conejos que habían sido mantenidos en ayunas du-
rante 12 horas con agua a placer, fueron anestesiados con
20 % de etiluretano que se inyectó en los mismos por vía
intraperitoneal a una dosis de 0,6 ml/100 g de peso corporal.
La sangre se extrae de la arteria carótida, antes (control) y
después de una hora y 30 minutos de la inyección intraperito-
20 neal de N,N'-bis(3-picolil)-4-metoxi-isoftalamida a dosis
de 25, 50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal. Las muestras
de sangre se recogen en una solución de citrato sódico al
3,8 % en la relación de 9:1 y después se centrifugan a 1000
rpm durante 15 minutos.

25 La actividad inhibidora de la agregación se calcula
con el método ya descrito para el ensayo in vitro, directamen-
te sobre los diversos plasmas tratados, después de su centri-
fugación.

30 La confirmación de la actividad inhibidora in vivo del
compuesto sobre la agregación de las plaquetas de la sangre
se ha obtenido inyectando intramuscularmente el compuesto en

1 cobayas a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal, así como tra-
tando por vía oral a voluntarios humanos con una dosis de
12 mg/kg de peso corporal y utilizando el mismo método de de-
terminación.

5 Resultados

10 Sobre la base de los ensayos realizados sobre el efec-
to inhibidor in vitro de la N,N'-bis(3-picolil)-4-metoxi-isof-
talamida sobre plasma de conejos, se calculó la concentración
que daba el 50 % de inhibición de la agregación de las plaque-
tas de la sangre (CI₅₀) por análisis probit. Se ha encontrado
que la concentración molar del compuesto, capaz de inhibir en
un 50 % la agregación de las plaquetas de la sangre, corres-
ponde a $5,2 \cdot 10^{-4} M$ (CI₅₀ in vitro).

15 En el cálculo del efecto inhibidor de la agregación
in vivo en ratones tratados por vía intraperitoneal, se ha en-
contrado que la dosis capaz de inhibir en un 50 % la agrega-
ción de las plaquetas de la sangre corresponde a 108,2 mg/kg
(CI₅₀ in vivo).

20 En los cobayas, la actividad del compuesto alcanzó un
máximo de 64,50 % en la cuarta hora después de su inyección,
mientras que el límite de tiempo al cual el efecto del com-
puesto desaparecía fué de 72 horas.

25 En el hombre, se encontró un efecto máximo del 70,11 %
a las 8 horas de la administración, mientras que el límite
del tiempo dentro del cual desaparece este efecto fué tam-
bién en este caso de 72 horas.

30 La toxicidad aguda del compuesto se determinó adminis-
trándolo intraperitonealmente a ratones suizos machos blan-
cos. Los ensayos de DL₅₀ (FL 95 %) se realizaron por el méto-
do de Litchfield y Wilcoxon (I. Pharm. exp. Ther., 96, 99/1949)

1 La siguiente tabla contiene los resultados de los ensayos com
parativos, donde el compuesto de la invención es denominado
G-137.

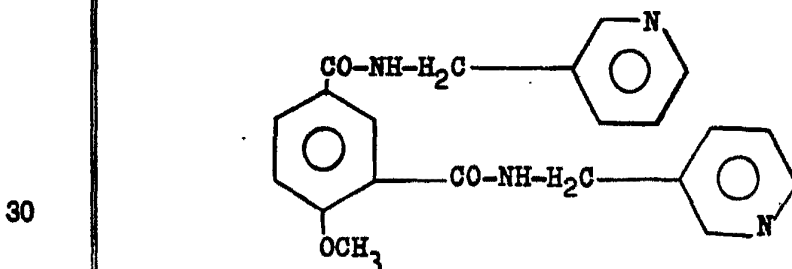
	<u>G-137</u>	<u>Aspirina</u>	<u>Heparina</u>	<u>Acido flu fenámico</u>
5 Inhibición de la agregación de plaquetas <u>in vitro</u>	$5,2 \cdot 10^{-4} M$	$9,04 \cdot 10^{-3} M$	-	$3,2 \cdot 10^{-3} M$
Actividad anticoa- gulante (tiempo de recalcificación)	$4,8 \cdot 10^{-3} M$	-	0,398 U.I./ ml	
10 Actividad fibrino- lítica <u>in vitro</u>	$8,7 \cdot 10^{-3} M$	-	-	$5,7 \cdot 10^{-3} M$
Actividad anti-in- flamatoria (ede- ma per carragenina)	inactivo	74,5 mg/kg	-	10,8 mg/kg
DL ₅₀	1205 mg/kg	495 mg/kg	-	235 mg/kg

15 Basándose en estos resultados y considerando su bají-
sima toxicidad, se espera que este compuesto encuentre su cam
po de aplicación en terapéutica, en forma de preparados ora-
les o parenterales, para todos aquellos estados en los que es
aconsejable reducir la tendencia a la agregación espontánea de
20 las plaquetas de la sangre, como los relacionados con la trom-
bofilia y la fibrinofilia.

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

REIVINDICACIONES

25 1. Un procedimiento para la preparación de N,N'-bis-(3-
picolil)-4-metoxi-isoftalamida de fórmula estructural:



1 que consiste en añadir a una solución de dicloruro de ácido
4-metoxi-isoftálico en tetrahidrofurano otra solución de 3-
aminometilpiridina en tetrahidrofurano y agregar gota a gota,
5 a la suspensión así formada, una solución de trietilamina en
tetrahidrofurano, calentar la mezcla a reflujo, destilar a
vacío el exceso de tetrahidrofurano, recoger el residuo con
un exceso de una solución acuosa saturada de NaHCO_3 , filtrar,
lavar el residuo sólido con agua, cristalizarlo en etanol y recris-
talizarlo en benceno.

10 2. Un procedimiento para la preparación del compuesto
de la Reivindicación 1, que consiste en añadir gota a gota
a una solución de 3-picolilamina en tetrahidrofurano otra so-
lución de dicloruro de ácido 4-metoxi-isoftálico, calentar
a reflujo y agitar esta mezcla hasta que la reacción es com-
15 pleta y verterla sobre una solución acuosa saturada de NaHCO_3 ,
filtrar el producto cristalino que se separa de esta última
mezcla y cristalizarlo en benceno.

20 3. Un procedimiento según la Reivindicación 1 que con-
siste en introducir en un matraz de 3 bocas 4,7 g (0,02 mo-
les) de dicloruro de ácido 4-metoxi-isoftálico disueltos en
50 ml de tetrahidrofurano, añadir una solución de 4,75 g
(0,044 moles) de 3-aminometilpiridina (3-picolilamina) en
50 ml de tetrahidrofurano, introducir gota a gota en la sus-
25 pensión formada en el matraz 4,44 g (0,044 moles) de trietil-
amina disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano y sucesivamente
calentar a reflujo la mezcla durante 20 horas, destilar a
vacío el exceso de tetrahidrofurano, recoger el residuo con
un exceso de una solución acuosa saturada de NaHCO_3 , filtrarlo,
30 lavar el residuo sólido con agua, cristalizarlo en etanol y
recristalizarlo en benceno.

1

4. Un procedimiento según la Reivindicación 2, que consiste en introducir gota a gota, en un matraz que contiene una solución de 95 g de 3-picolilamina en 50 ml de tetrahidrofurano, 4,7 g (0,02 moles) de dicloruro de ácido 4-metoxi-isoftálico disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano, calentar a reflujo y agitar la mezcla durante 16 horas; una vez completada la reacción, verterla sobre un exceso de una solución acuosa saturada de NaHCl_3 , filtrar el producto cristalino que se ha separado al cabo de cierto tiempo de la solución y recristalizarlo en benceno.

5

10

5. Se reivindica por último como objeto sobre el que que ha de recaer la patente de invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE N, N'-bis-(3-picolil)-4-metoxi-isoftalamida.

15

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de nueve páginas mecanografiadas.

20

Madrid, 11 febrero 1.975

BERNARDO UNGRIA

P.P.

25

30