



19	ES	21	461099	10	A1
		22	FECHA DE PRESENTACION 28 Julio de 1.977		

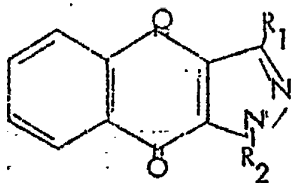
PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
1	COXD	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA MEZCLA SEPARABLE DE N-1 y N-2 GLICOSIL-BENZ [f]INDAZOL-4,9-DIONAS"		
71 SOLICITANTE (S)		
Consejo Superior Investigaciones Cientificas		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Serrano, 150 - Madrid-6		
72 INVENTOR (ES)		
D. Gregorio Alonso Corziguera, Da. Mercedes Fuertes González, Da. Ma. Teresa García López, D. Federico Gómez de las Heras Martín Maestro, D. José Ma. Infante Redondo y D. Manfredo Stud Schlüter		
73 TITULAR (ES)		
Consejo Superior Investigaciones Cientificas		
74 REPRESENTANTE		
D. Javier Trueba Gutiérrez		

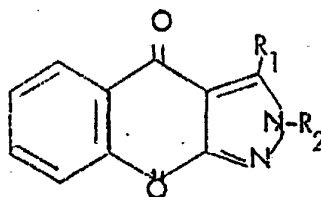


MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una mezcla separable de N-1 y N-2 glicosil benz [f] indazol-4,9-dionas de fórmulas generales I y II respectivamente, que se indican a continuación



I

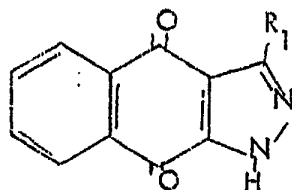


II

en donde R_1 representa hidrógeno, un grupo alquilo inferior, arilo, aralquilo o una función derivada de ácido carboxílico tal como carboxilato de alquilo, $-CO_2R_3$, donde R_3 es alquilo inferior; nitrilo, $-CN$, carboxamida; $-CONH_2$; etc, y R_2 es un radical glicosídico que puede tener sus grupos hidroxilo libres o bien protegidos total o parcialmente mediante funciones ester, éter, etc. El término de glicosilo empleado para indicar la significación de R_2 ha de entenderse en un sentido amplio, tanto en lo que respecta al número de átomos de carbono que pueda contener, a la presencia de dobles o triples enlaces en el esqueleto, al número de sus hidroxilos libres o protegidos, a la distribución de estos grupos a lo largo del esqueleto hidrocarbonado, a la presencia de otras funciones o ramificaciones en dicho esqueleto o a la ausencia de sustituyentes en algunas posiciones. En tal sentido y como ejemplos representativos, pero no únicos, de estas posibilidades, pueden mencionarse los glicosídicos correspondientes a las hexosas, pentosas, desoxicetosas o aminocetosas. También la expresión hidroxilo protegido debe tomarse en un sentido amplio que incluya grupos acilo, isopropiliden, benciliden y demás grupos protectores habitualmente empleados en la química de azúcares, sobradamente conocidos por los especialistas.

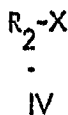
El procedimiento a que se refiere la presente invención se caracteriza por las dos etapas que se indican a continuación.

Etapas I a.: Glicosidación de una quinona heterocíclica de fórmula general III siguiente



III

5 en donde R_1 mantiene la significación mencionada, con un derivado glicosídico de fórmula general IV



15 en donde R_2 mantiene la significación mencionada y X representa halógeno, -SH, -OH, -SR₄, -OR₄, en donde R_4 representa alquilo, aralquilo, arilo, alquilcarbonilo, especialmente acetilo o arilcarbonilo, por ejemplo benzoilo, para dar lugar a una mezcla de los compuestos I y II antes mencionados.

20 Los compuestos de fórmula general III pueden obtenerse por cicloadición de diazoalcanos a naftoquinona según los procedimientos descritos por R. Huisgen, Angew. Chem. Int. Ed. 2, 565 (1963), ibid 2, 633 (1963). ibid 7, 321 (1968) y más concretamente por I. Awad y A. Boules Can. J. Chem. 42, 2665 (1964) y L.F. Fieser y M.A. Peters, J. Am. Chem. Soc. 53, 4080 (1931).

Los compuestos de fórmula general IV son en gran parte de procedencia comercial o pueden prepararse a partir de ellos mediante una reacción sencilla.

25 La reacción de glicosidación es comunmente conocida en la química de nucleosidos, y puede realizarse mediante cualquiera de la técnicas conocidas por los especialistas en la química de nucleosidos. Estas técnicas utilizan condiciones de reacción algo distintas, pero su objetivo es siempre el mismo, la creación del enlace glicosídico entre la base y el azúcar o, aplicado en nuestro caso, entre la quinona heterocíclica y el derivado glicosídico.

30 Las técnicas de glicosidación son principalmente tres. La denominada de Hilbert-Johnson, la del metal pesado y la de fusión. Sin embargo, las técnicas que cumplen con las condiciones enunciadas para esta primera etapa son sólo las dos últimas: a) la del metal pesado, que consiste en la reacción de un derivado, de pla-



ta o de mercurio, de la base con el derivado glicosídico. Una de las variantes de esta técnica es la denominada del "cianuro mercúrico-nitrometano", que consiste en calentar a reflujo una mezcla de la base heterocíclica con el derivado glicosídico, en presencia de cianuro mercúrico, y todo ello en el seno de nitrometano que actúa como medio de reacción. En este caso el cianuro mercúrico actúa como aceptor del hidrácido generado. Esta técnica, debida a N. Yamaoka, K. Aso y K. Matsuda, J. Org. Chem **30**, 149 (1965), es muy conveniente por su sencillez y buenos resultados. b) La denominada técnica de fusión que consiste en calentar a vacío la base o quinona heterocíclica y el derivado glicosídico en ausencia de disolvente y en presencia de un ácido prótico o de Lewis que actúa de catalizador. Esta técnica ha sido desarrollada para la síntesis de glicósidos por B. Helferich y col. Ber. **94**, 158 (1961) (veáanse también las referencias citadas en este trabajo). La aplicación de este método a los nucleosidos fué realizada por primera vez por T. Sato, T. Shimadate y Y. Ishido, Nippon Kagaku Zasshi (J. Chem. Soc. Japan) **81**, 1440 (1960) y posteriormente por un gran número de investigadores.

Debe entenderse que lo verdaderamente esencial en esta primera etapa es la glicosidación, es decir la creación del enlace glicosídico entre la quinona heterocíclica y el derivado de azúcar. Asimismo, debe entenderse que la utilización de una u otra técnica de las dos mencionadas no es crítica para el procedimiento, ya que ambas conducen a mezclas análogas de los productos de fórmula general I y II, con rendimientos parecidos. Por último debe entenderse que la utilización de ambas técnicas en esta memoria descriptiva no constituye dualidad de procedimiento, ya que ambas son sólo técnicas optativas de glicosidación, perfectamente conocidas por los especialistas.

Etapa 2a. Separación y purificación cromatográfica de los productos de fórmula general I y II que forman parte de la mezcla obtenida en la etapa anterior, utilizando un soporte adecuado y un disolvente o una mezcla de disolventes inertes adecuados. Debido a la similitud estructural de los compuestos de fórmula general I y II las técnicas de separación deben ser extremadamente sensibles y selectivas, siendo por su naturaleza las técnicas cromatográficas las más adecuadas.

Debe entenderse que aunque en esta memoria descriptiva se utiliza la cromatografía de capa fina preparativa como técnica de separación y purificación, ello no debe considerarse como limitativo del procedimiento.

En esta memoria se utiliza como soporte un gel de sílice comercial

(PF₂₅₄, Merck), sin embargo la separación y purificación de la mezcla de los productos de fórmula general I y II, puede realizarse también mediante otros tipos de gel de sílice y otros tipos de soportes. Por ello, el empleo de la gel de sílice como soporte no debe considerarse limitativo para el procedimiento descrito en esta memoria.

5 Pueden emplearse como disolventes inertes todos los que no reaccionan con los productos en contacto con el soporte, por ejemplo hexano, éter de petróleo, éter sulfúrico, acetato de etilo, cloroformo, cloruro de metileno, benceno, acetonitrilo, metanol, etanol, etc.

10 La separación y purificación de la mezcla de productos de fórmula general I y II, obtenida en la primera etapa se realizó mediante la técnica que se describe de modo ilustrativo, pero no limitativo, a continuación.

15 La mezcla de I y II se extiende con una pipeta sobre una línea recta paralela a uno de los lados de una película cuadrada de gel de sílice, de grosor uniforme (aproximadamente 2 mm.) adherida sobre la superficie rígida de una placa de vidrio, aluminio u otro metal. La línea debe distar del borde de la superficie rígida 1,5 cm. aproximadamente. Las placas, así inoculadas, se introducen verticalmente en una cubeta, de tal forma que la línea marcada con la mezcla esté paralela a la superficie del disolvente, muy próxima a él (menos de 5 mm.), y no sumergida en su seno. El disolvente empieza entonces a ascender por la placa, arrastrando a los componentes de la mezcla de diferente forma. Cuando el disolvente ha alcanzado el límite superior de la gel de sílice, se sacan las placas de la cubeta, se secan y se examinan a la luz ultravioleta. Si las bandas correspondientes a los productos I y II no están suficientemente separadas, se vuelven a introducir en la cubeta con disolvente, repitiendo el proceso las veces que sean necesarias (el número de desarrollos no suele pasar de diez). Cuando la separación entre las bandas es neta a la luz ultravioleta o a simple vista, si las quinonas son suficientemente coloreadas, se marcan los bordes de las bandas y la gel de sílice se separa de la superficie rígida. Después de reunir la gel de sílice de las bandas correspondientes a un mismo producto, se extrae con un disolvente inerte, no acuoso, tal como acetato de etilo, cloroformo, metanol o etanol, o una mezcla de ellos.

25 Los productos así obtenidos son generalmente muy puros, sin embargo en caso necesario puede repetirse el proceso de purificación cromatográfica.

30 Los compuestos de fórmula general I y II que pueden obtenerse median



te el procedimiento a que se refiere esta invención no aparecen descritos en la bibliografía científica previa y presentan cierta potencialidad como agentes citostáticos. Su estructura de quinonas heterocíclicas presenta semejanzas con las de algunos fármacos utilizados en el tratamiento del cancer, tales como la streptonigrina, o las mitomicinas, que también incluyen en su molécula un grupo quinónico condensado con un heterociclo. De hecho, alguno de estos compuestos, ha presentado una actividad citostática sobre células HeLa cultivadas "in vitro" en medios adecuados, claramente inhibidora, siendo la dosis de inhibición 50 (DI₅₀) del orden de 9 µg/ml. Esto, como el especialista conoce, de acuerdo con la normativa del National Cancer Institute de los Estados Unidos sobre desarrollo e investigación de fármacos, universalmente aceptada, hace de estos productos y de las variaciones lógicas que el método de preparación permite, buenos candidatos a nuevos fármacos para el tratamiento y control de situaciones cancerosas.

Por último, la amplia gama de posibles variaciones en el sustituyente glicosídico R₂ y en el sustituyente sobre el anillo quinónico R₁, que ofrece el procedimiento a que se refiere esta invención, introduce un aliciente más en cuanto a un aprovechamiento médico de los productos, por lo que tiene de positivo en una modulación de las propiedades fisicoquímicas reguladoras de la solubilidad, absorción, penetración celular o distribución en tejidos.

Los ejemplos siguientes, que ilustran el procedimiento a que se refiere esta invención, no deben considerarse limitativos de la misma.

Ejemplo 1

1- y 2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetil-β-D glucopiranosil)-benz [f] indazol-4,9-diona (I y II)
R₁ = H, R₂ = 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilo)

Etapa 1a.

Una mezcla de 2,06 g (5 mmoles) de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranososa, 1,35 g (11 mmoles) de cianuro mercúrico, 0,99 g (5 mmoles) de benz [f] indazol-4,9-diona y 50 ml de nitrometano anhidro se calienta a reflujo durante 5 horas. Al cabo de este tiempo, se filtra en caliente para eliminar el residuo insoluble, se lava con 15 ml de nitrometano caliente y el filtrado se evapora a vacío hasta sequedad. El jarabe que así se obtiene, se trata con 40 ml de cloroformo y se separa por filtración el resto insoluble. El extracto clorofórmico se lava dos veces con 25 ml de una disolución acuosa de yoduro potásico al 30%, luego con agua y finalmente se seca sobre



sulfato sódico. Al evaporar el disolvente se obtiene la mezcla de productos indicados en el epigrafe que se separan y purifican como se señala en la

Etapa 2a.

5 La mezcla de N-glicósidos, disuelta en la mínima cantidad de acetato de etilo, se aplica sobre 15 placas preparativas de gel de sílice que se desarrollan una vez con una mezcla de cloroformo-acetato de etilo 4:1. De esta manera se observa a la luz ultravioleta (254 nm) la presencia de dos bandas fundamentales que se extraen en la forma usual de esta técnica.

10 La banda más polar corresponde al producto I. Pf, 180-181°C (de acetato de etilo-éter de petróleo).

La banda menos polar corresponde al producto II. Pf, 157-158 (de metanol).

Análisis

15 Calculado para $C_{25}H_{24}N_2O_{11}$: C, 56,81%; H, 4,57%; N, 5,30%

Encontrado para I: C, 56,65%; H, 4,50%; N, 5,48%

Encontrado para II: C, 56,73%; H, 4,47%; N, 5,50%

Actividad citostática sobre células HeLa

<u>Compuesto</u>	<u>DI₅₀ (µg/ml)</u>
I	9
II	≈ 100

Ejemplo 2

I- y 2-(2,3,5-Tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-benz [f] indazol-4,9-diona (I y II; R₁ = H, R₂ = 2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosilo)

Etapa 1a.

25 Una mezcla de 3,77 g (7,5 mmoles) de cloruro de 2,3,5-tri-O-benzoil-D-ribofuranosa, 2,05 g (18 mmoles) de cianuro mercúrico y 1,50 g (7,5 mmoles) de benz [f] indazol-4,9-diona en 75 ml de nitrometano anhidro se calienta a reflujo durante 6 horas. Pasado este tiempo se filtra en caliente para eliminar el residuo insoluble, se lava con 25 ml de nitrometano caliente, y el filtrado se evapora a vacío hasta sequedad. El jarabe que así se obtiene se trata con 60 ml de cloroformo y se filtra. La disolución clorofórmica se lava dos veces con 40 ml de una disolución de yoduro potásico al 30%, luego con agua y por último se seca sobre sulfato sódico. Por evaporación del disol

30



ventese obtiene la mezcla de N-glicósidos que se separan y purifican como se indica en la Etapa 2a.

La mezcla de productos, disuelta en la mínima cantidad de cloroformo, se aplica sobre unas 28 placas de cromatografía preparativa y se desarrollan dos veces con cloroformo-ciclohexano 17:3. De esta manera se observa a la luz ultravioleta la separación de dos bandas fundamentales. La banda de mayor recorrido corresponde al isómero N-1 sustituido, I, que recristaliza de propanol, pf 86-87° C.

La banda de menor recorrido corresponde al isómero N-2 sustituido, II, que cristaliza de propanol, pf 89-90° C

Análisis

Calculado para $C_{37}H_{26}N_2O_9$: C, 69,15% ; H, 4,07% ; N, 4,35%

Encontrado para I: C, 68,51% ; H, 4,10% ; N, 3,92%

Encontrado para II: C, 68,76% ; H, 4,28% ; N, 3,99%

Ejemplo 3

1- y 2- (2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil) -3-carboxi-benz [f] indazol -4,9-diona (I y II; $R_1=CO_2Et$, $R_2=2,3,4,6$ -tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosilo)

Etapa 1a.:

Una mezcla de 1,70 g (4 mmoles) de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranososa, 1,00 g (9 mmoles) de cianuro mercurico y 0,998 g (3,6 mmoles) de 3-carboxy-benz [f] indazol-4,9-diona en 35 ml de nitrometano anhidro se calienta a reflujo durante 5 horas. Pasado este tiempo, se filtra en caliente, y el residuo insoluble se lava con nitrometano caliente. El filtrado se evapora a sequedad a vacio, y el jarabe que así se obtiene, se trata con 30 ml de cloroformo, separando por filtración el resto insoluble. El extracto clorofórmico, se lava dos veces con 20ml de una disolución acuosa de yoduro potásico al 30%, después con agua y finalmente se seca sobre sulfato sódico. Por evaporación del disolvente se obtienen los productos nombrados en el epígrafe que se separan y purifican como se indica en la Etapa 2a.

La mezcla bruta de isómeros se separa por cromatografía preparativa sobre unas 18 placas de gel de sílice. Desarrollando dos veces con cloroformo-acetato de etilo 9:1 se observa la separación de dos bandas fundamentales. La banda de mayor recorrido corresponde al isómero N-1 sustituido, I, que se cristaliza de acetato de etil



lo, pf225-226°C.

El producto obtenido de la banda de menor recorrido se purifica mediante una nueva cromatografía sobre 4 placas preparativas, utilizando la misma mezcla desarrollante que en el proceso anterior. Elución de la banda fundamental conduce al isómero N-2 sustituido, II, que se cristaliza de metanol, pf 109-111°C.

Análisis

Calculado para $C_{28}H_{28}N_2O_{13}$: C, 56,00% ; H, 4,66% ; N, 4,66%

Encontrado para I: C, 55,78% ; H, 4,54% ; N, 4,76%

Encontrado para II: C, 55,61% ; H, 4,51% ; N, 4,58%

Actividad citostática sobre células HeLa

<u>Compuesto</u>	<u>DI₅₀ (µg/ml)</u>
I	> 100
II	≈ 100

Ejemplo 4

2-(2,3,5-Tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-3-carboxi-benz [f] indazol-4,9-diona
(II; R₁=CO₂Et, R₂=2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosilo)

Etapa 1a.

Una mezcla de 2,07 g (4mmoles) de cloruro de 2,3,5-tri-O-benzoil-D-ribofuranosa, 1,00 g (9 mmoles) de cianuro mercúrico y 0,91 g (3,3 mmoles) de 2-carboxi-benz [f] indazol-4,9-diona en 35 ml de nitrometano anhidro se calienta a reflujo durante 6 horas. Al cabo de este tiempo, se filtra en caliente y se lava con nitrometano caliente. El filtrado se evapora a sequedad de vacío y el jarabe que se obtiene se trata con 30 ml de cloroformo, separando por filtración el resto insoluble. El extracto cloroformico se lava dos veces con yoduro potásico al 30%, después con agua y finalmente se seca sobre sulfato sódico. Por evaporación del disolvente se obtiene la mezcla de productos arriba indicada que se separan y purifican como se señala en la

Etapa 2a.

La mezcla isómerica se aplica sobre unas placas preparativas que se desarrollan unas tres veces con cloroformo-ciclohexano 17:3 y otras tres veces con cloroformo. Elución de la banda fundamental conduce al producto deseado en forma de sirupe que adquiere una consistencia sólida al tratarlo con ciclohexano. Aunque no se pudo cristalizar, su identidad y estructura quedan confirmadas en base a sus datos espectroscópicos.



Análisis

Calculado para $C_{40}H_{30}N_2O_{11}$: C, 67,22% ; H, 4,23% ; N, 3,92%

Encontrado: C, 67,03% ; H, 4,35% ; N, 3,73%

Ejemplo 5

5 1-(2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-3-carboxi-benz [f] indazol-4,9-diona (I; $R_1=CO_2Et$, $R_2=2,3,4,6$ -tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosilo)

Etapa 1a.

10 Una mezcla de 0,81 g (3mmoles) de 3-carboxi-benz [f] indazol-4,9-diona, 1,17 g (3mmoles) de pentaacetil glucopiranososa y una punta de espátula de ácido p-toluensulfónico como catalizador, se calienta a vacío (~20 mm) a 160-170°C durante unos 15 minutos, tiempo al cabo del cual ya no se desprende ácido acético. Una vez fría la mezcla de reacción se trata como se indica a continuación en la

Etapa 2a.

15 La masa bruta de reacción se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo y se aplica sobre unas 20 placas de cromatografía preparativa que se desarrollan una vez con cloroformo-acetato de etilo 3:1. Por elución de la banda fundamental se obtiene el producto deseado, que es idéntico en todas sus propiedades al isómero N-1 sustituido descrito en el ejemplo 3.

Ejemplo 6

20 2-(2,3,5-Tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-3-carboxi-benz [f] indazol-4,9-diona (II; $R_1=CO_2Et$, $R_2=2,3,5$ -tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosilo)

Etapa 1a.

25 Una mezcla de 0,54 g (2 mmoles) de 3-carboxi-benz [f] indazol-4,9-diona, 1,01 g (2mmoles) de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-D-ribosa y una pequeña cantidad de ácido p-toluensulfónico como catalizador, se calienta a unos 140°C a vacío (~20mm) durante 5 minutos, tiempo al cabo cual ya no se desprende ácido acético. Una vez fría la mezcla de reacción se purifica como se indica en la

Etapa 2a.

30 Una masa bruta de reacción, disuelta en la mínima cantidad de cloroformo, se aplica a 20 placas de cromatografía preparativa que se desarrollan unas siete veces con acetato de etilo-éter de petróleo 2:5. La banda fundamental corresponde al producto deseado, que es idéntico en todas sus propiedades al isómero N-2 sustituido, descrito en el ejemplo 4.



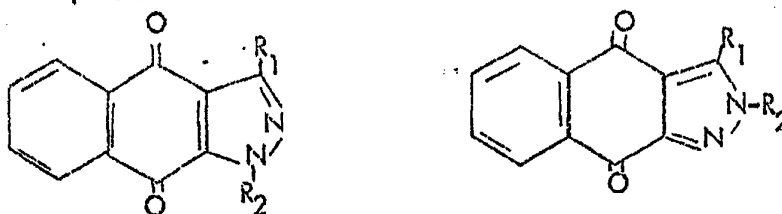
En resumen la patente de invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1) "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA MEZCLA SEPARABLE DE N-1 Y N-2 GLICOSIL-BENZ [f] INDAZOL-4,9-DIONAS", de fórmula general I y II respectivamente

10



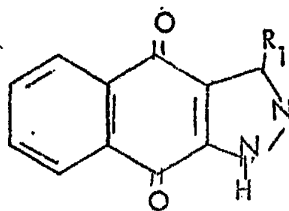
15

en donde R_1 representa hidrógeno, un grupo alquilo inferior, arilo, aralquilo o una función derivada de un ácido carboxílico, tal como carboxilato de alquilo, $-CO_2R_3$, donde R_3 es alquilo inferior; nitrilo, $-CN$; carboxamida, $-CONH_2$, etc, y R_2 representa siempre un radical glicosídico que puede tener sus grupos hidroxilo libres o protegidos total o parcialmente mediante funciones éter o ester; caracterizado por las dos etapas de reacción que se indican a continuación.

20

Etapla 1a. : Glicosidación de una quinona heterocíclica de fórmula general III siguiente

25



en donde R_1 mantiene la significación mencionada, con un derivado glicosídico de fórmula general IV siguiente



IV

30

en donde R_2 mantiene la significación mencionado, y X representa halógeno, $-SH$, $-OH$, $-SR_4$, ó $-OR_4$, en donde R_4 representa alquilo, aralquilo, arilo, alquilcarbonilo, espe-



cialmente acetilo, o arilcarbonilo, por ejemplo benzoilo, para dar lugar a una mezcla de los compuestos de fórmula general I y II antes mencionados.

Etapa 2a.: Separación y purificación cromatográfica de los productos de fórmula general I y II que forman parte de la mezcla obtenida en la etapa anterior, utilizando un soporte adecuado y un disolvente inerte adecuado.

2) Un procedimiento, según reivindicación 1, y caracterizado porque el compuesto de fórmula general III es benz [f] indazol-4,9-diona (III, $R_1 = H$).

3) Un procedimiento, según reivindicación 1, y caracterizado porque el compuesto de fórmula general III es 3-carboxi-benz [f] indazol-4,9-diona (III, $R_1 = CO_2CH_2CH_3$).

4) Un procedimiento, según reivindicación 1, y caracterizado porque el sustituyente R_2 del derivado glicosídico de fórmula general IV, posee cinco o más átomos de carbono que, según los casos, llevan unidos grupos hidroxilo libres o protegidos con funciones éter o ester, o llevan unidas otras funciones o no están funcionalizados o contienen dobles o triples enlaces.

5) Un procedimiento, según reivindicación 1, y caracterizado porque el sustituyente R_2 del derivado glicosídico de fórmula general IV, es un resto de tetra-O-acetil-D-glucosa.

6) Un procedimiento, según reivindicación 1, y caracterizado porque el sustituyente R_2 del derivado glicosídico de fórmula general IV, es un resto de tri-O-benzoil-D-ribosa.

7) Un procedimiento, según reivindicación 1, y caracterizado porque la glicosidación correspondiente a la etapa 1a., se realiza mediante la técnica denominada del "cianuro mercurio-nitrometano".

8) Un procedimiento, según reivindicación 1, y caracterizado porque la glicosidación correspondiente a la etapa 1a., se realiza mediante la técnica denominada de "fusión".

9) Un procedimiento, según reivindicación 1, y 8, y caracterizado porque el catalizador ácido empleado en la glicosidación por la técnica de "fusión", descrita en la etapa 1a., es ácido p-toluensulfónico.

10) Un procedimiento, según reivindicación 1, y caracterizado porque la separación y purificación cromatográfica se realiza sobre placas preparativas de gel de



sílice, utilizando como eluyente cloroformo, acetato de etilo, éter de petróleo, ciclohexano, o mezcla de ellos.

5 11) "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA MEZCLA SEPARABLE DE N-1 Y N-2 GLICOSIL-BENZ [f] INDAZOL-4,9-DIONAS", tal y como se describe en el cuerpo de esta memoria y reivindicaciones que consta de 13 páginas escritas por una sola cara.

Juan Vazquez

A