



ESPAÑA

20 NOV. 1978

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

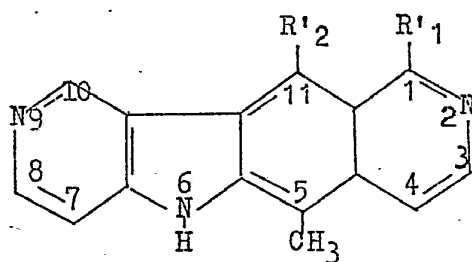
19 ES	21	NUMERO	468.721	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION	12-4-1978	

90 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
77/11.148	13-4-1977	Francia
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIARIA
	C07D; A61K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA OBTENER DIPIRIDO/4,3-b/3,4-f/INDOLES"		
71 SOLICITANTE (S)		
AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR) (3661 ES 1403)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
13, rue Madeleine Michelis, 92522 NEUILLY SUR SEINE, Francia		
72 INVENTOR (ES)		
Emile BISAGNI, Claire DUCROCQ, Christian RIVALLE, Pierre TAMBOURIN, Françoise WENDLING, Jean-Claude CHERMANN y Luc MONTAGNIER		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-68.761)		

jga

POOR
QUALITY

1 La presente invención, en cuya realización han
 participado el Sr. Emile BISAGNI, la Srta. Claire DUCROCO,
 el Sr. Christian RIVALIE, el Sr. Pierre TAMBOURIN y la Srta.
 Françoise WENDLING, de la Fundación Curie, Instituto del
 5 Radio, así como los Sres. Jean-Claude CHERMANN y Luc MON-
 TAGNIER, del Instituto Pasteur, se refiere a un procedi-
 miento para obtener dipirido[4,3-b][3,4-f]indoles que
 presentan propiedades farmacéuticas, y más en particular
 a un procedimiento para obtener dipirido [4,3-b][3,4-f]-
 10 indoles que responden a la fórmula general II:



II

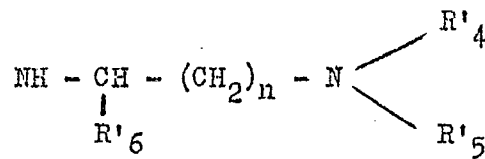
15
 20 así como sus sales aceptables en farmacia, y sus formas
 tautómeras e isómeras cuando existen.

En la fórmula anterior II: R'₁ es hidrógeno, el
 grupo hidroxilo, un grupo alcohol, de preferencia inferior,
 un grupo alcohiltilio o alcoxi, un halógeno, tal como cloro,
 25 o un grupo amino; R'₂ es hidrógeno o un grupo alcohol
 inferior, de preferencia un grupo metilo.

En la presente descripción, el término "alcohol
 inferior" designa a los grupos alcohol que tienen 1 a 3
 átomos de carbono, y de preferencia el grupo metilo.

30 A título de grupos amino apropiados se puede ci-

1 tar el grupo de fórmula:



5

en la que n está comprendido entre 1 y 3, R'_6 es hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, por ejemplo el grupo CH_3 , y R'_4 y R'_5 son idénticos o diferentes, y representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo alcoholo inferior; de preferencia los grupos R'_4 y R'_5 son idénticos y son hidrógeno, el grupo metilo o el grupo etilo.

10

La presente invención se refiere, por tanto, a un procedimiento para obtener dichos dipirido[4,3-b]-[3,4-f]indoles.

15

El procedimiento según la presente invención consiste en:

- 1) hacer reaccionar una amino-6-isoquinoleína con nitro-3-cloro-4-piridina, para formar la correspondiente [(nitro-3'-piridil)-4'-amino]-6-isoquinoleína;
- 20 2) hidrogenar dicha isoquinoleína así obtenida, al compuesto amino correspondiente;
- 3) hacer reaccionar el compuesto amino correspondiente con nitrito sódico, para formar la triazolopiridina correspondiente;
- 25 4) transformar la triazolopiridina así obtenida en el dipirido [4,3-b][3,4-f]indol correspondiente;
- 5) formar eventualmente la sal aceptable en farmacia del dipiridoindol así obtenido.

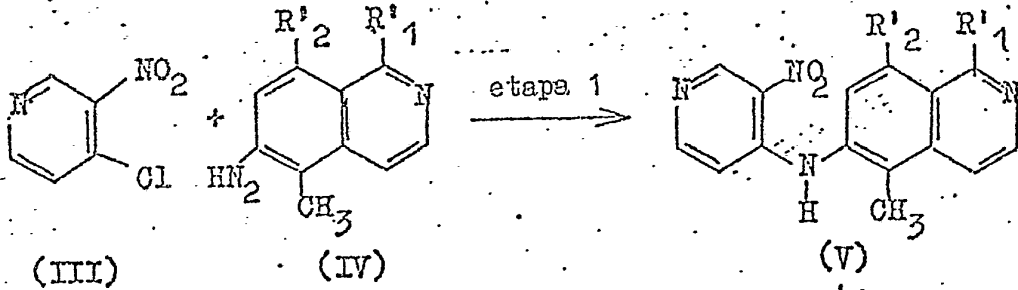
25

El procedimiento de la invención se puede representar por el esquema de reacción siguiente:

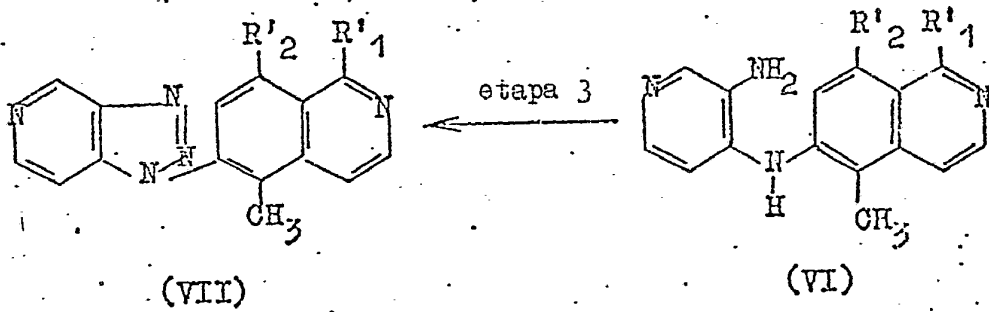
30

1

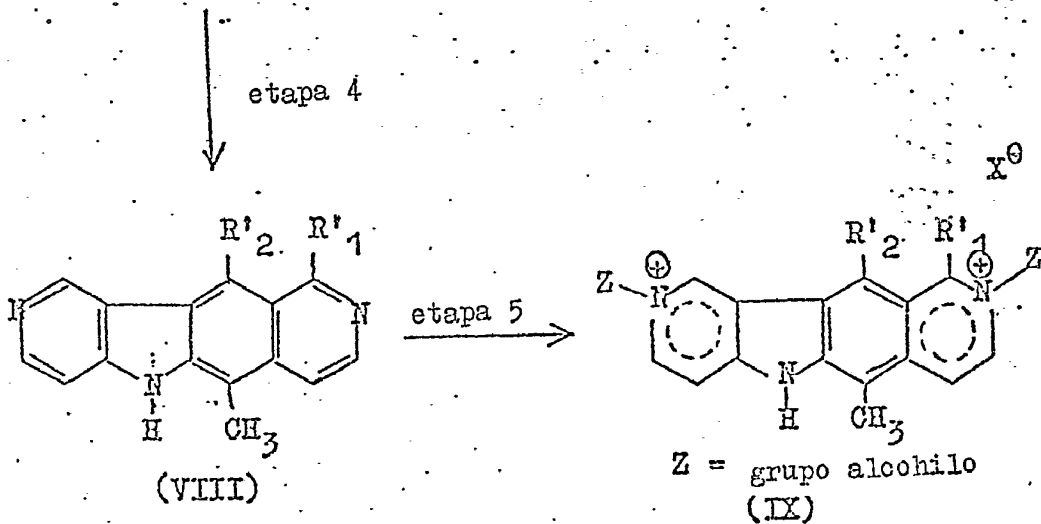
5



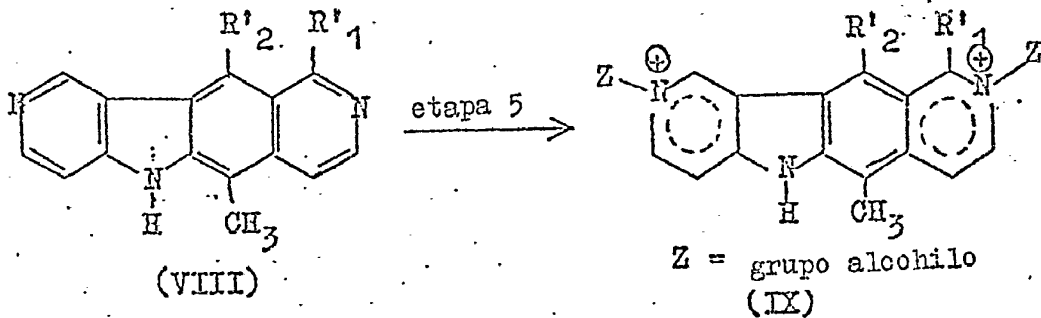
10



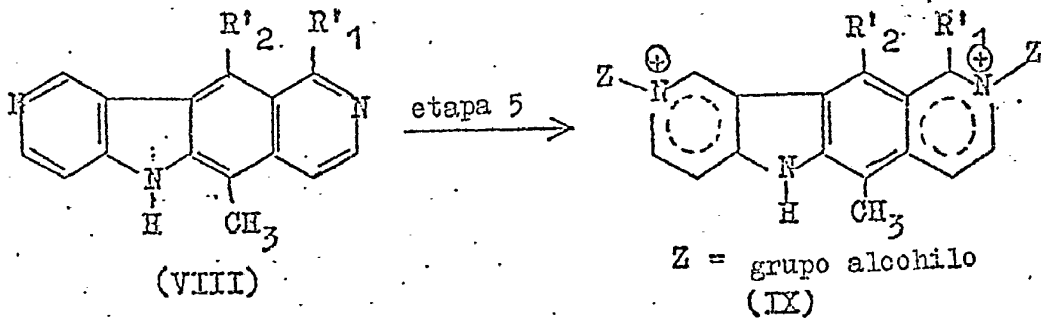
15



20



25



Los productos de partida usados en el procedimiento de la invención son, por tanto, la nitro-3-cloro-4-piridina de fórmula (III) y las amino-6-isoquinoleínas de fórmula (IV).

30

La etapa 1) del procedimiento de la invención

1 consiste en condensar la nitro-3-cloro-4-piridina de fórmula III con una amino-6-isoquinoleína de fórmula IV. Esta condensación se puede realizar según diferentes modos de operación bien conocidos por el experto en la técnica, variando esos modos de operación según la naturaleza de los sustituyentes R'_1 y R'_2 de la amino-6-isoquinoleína usada.

5 Así, cuando la amino-6-isoquinoleína usada no comprende sustituyentes hidroxilo, se puede trabajar de la manera siguiente:

10 Se disuelve la amino-6-isoquinoleína en un disolvente inerte apropiado, tal como dimetoxi-1,2-etano, se añade una solución de ácido anhidro, tal como ácido clorhídrico, en un disolvente anhidro, y luego la nitro-3-cloro-4-piridina. Se mantiene a reflujo la mezcla de reacción así obtenida, hasta desaparición prácticamente completa de uno de los reactivos, lo que se puede determinar por medidas de cromatografía en capa delgada; luego se evapora el disolvente.

15 Cuando la amino-6-isoquinoleína usada comprende un sustituyente hidroxilo, es ventajoso trabajar a temperatura ambiente; los compuestos de partida se pueden disolver en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida. Se deja a temperatura ambiente la mezcla de reacción obtenida por mezcla de las soluciones de los dos constituyentes de partida, hasta desaparición de los compuestos de partida que son visibles por cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice. Luego se recupera por técnicas clásicas el precipitado formado.

20 Se utilizan ventajosamente cantidades equimolares

1 o prácticamente equimolares de los dos compuestos de parti-
da.

5 La etapa 2) del procedimiento según la invención
consiste en una hidrogenación de la $\left[\text{(nitro-3'-piridil)-} \right]$ -
-4'-amino $\left] \text{-6-isoquinoleína}$ obtenida según la etapa 1) an-
tes descrita. Esta hidrogenación se realiza en presencia
de un catalizador de hidrogenación tal como carbono pala-
diado. La $\left[\text{(nitro-3'-piridil)-} \right]$ -4'-amino $\left] \text{-6-isoquinoleína}$
se disuelve en un disolvente orgánico tal como, por ejem-
10 plo, ácido acético; se añade a esta solución una cantidad
apropiada de carbono paladiado, y se agita en atmósfera
de hidrógeno hasta la absorción teórica de hidrógeno. Tie-
go se elimina el catalizador por filtración; se evapora el
disolvente, y el residuo obtenido se recristaliza en un di-
15 solvente orgánico, tal como metanol, etanol, acetonitrilo,
xileno, etc.

Según la etapa 3) del procedimiento según la in-
vención, se fabrica la triazolopiridina correspondiente
tratando la $\left[\text{(amino-3'-piridil)-} \right]$ -4'-amino $\left] \text{-6-isoquinoleí-}$
20 na de fórmula VI con nitrito sódico. Se trabaja ventajosa-
mente de la manera siguiente: se disuelve la $\left[\text{(amino-3'-}$
piridil)-4'-amino $\left] \text{-6-isoquinoleína}$ en un ácido orgánico
tal como ácido acético, se enfría la mezcla obtenida hasta
aproximadamente 0°C, y se añade progresivamente una solu-
25 ción acuosa de nitrito sódico en el mínimo de agua. La mez-
cla de reacción se agita hasta que la temperatura vuelve
a la ambiente; luego se lava y seca el precipitado formado,
según métodos clásicos.

30 Según la etapa 4) del procedimiento de la inven-
ción, la triazolopiridina obtenida según la etapa 3) se

1 _transforma en el dipirido [4,3-b][3,4-f]indol corres-
pondiente. En el curso de esta transformación se produce
una apertura del ciclo triazolo, y una ciclización, para
5 formar un dipirido-indol de fórmula VIII. Esta operación
se realiza en el seno de un agente inerte tal como parafina
o fenantreno, que tenga un punto de ebullición suficien-
temente elevado para permitir la transformación indicada,
que se realiza por vía térmica.

10 Se trabaja habitualmente a una temperatura de
320-350°C.

Más adelante se darán ejemplos de realización
de esta etapa.

15 El dipirido [4,3-b][3,4-f]indol así obtenido
se transforma luego eventualmente en una sal aceptable en
farmacia.

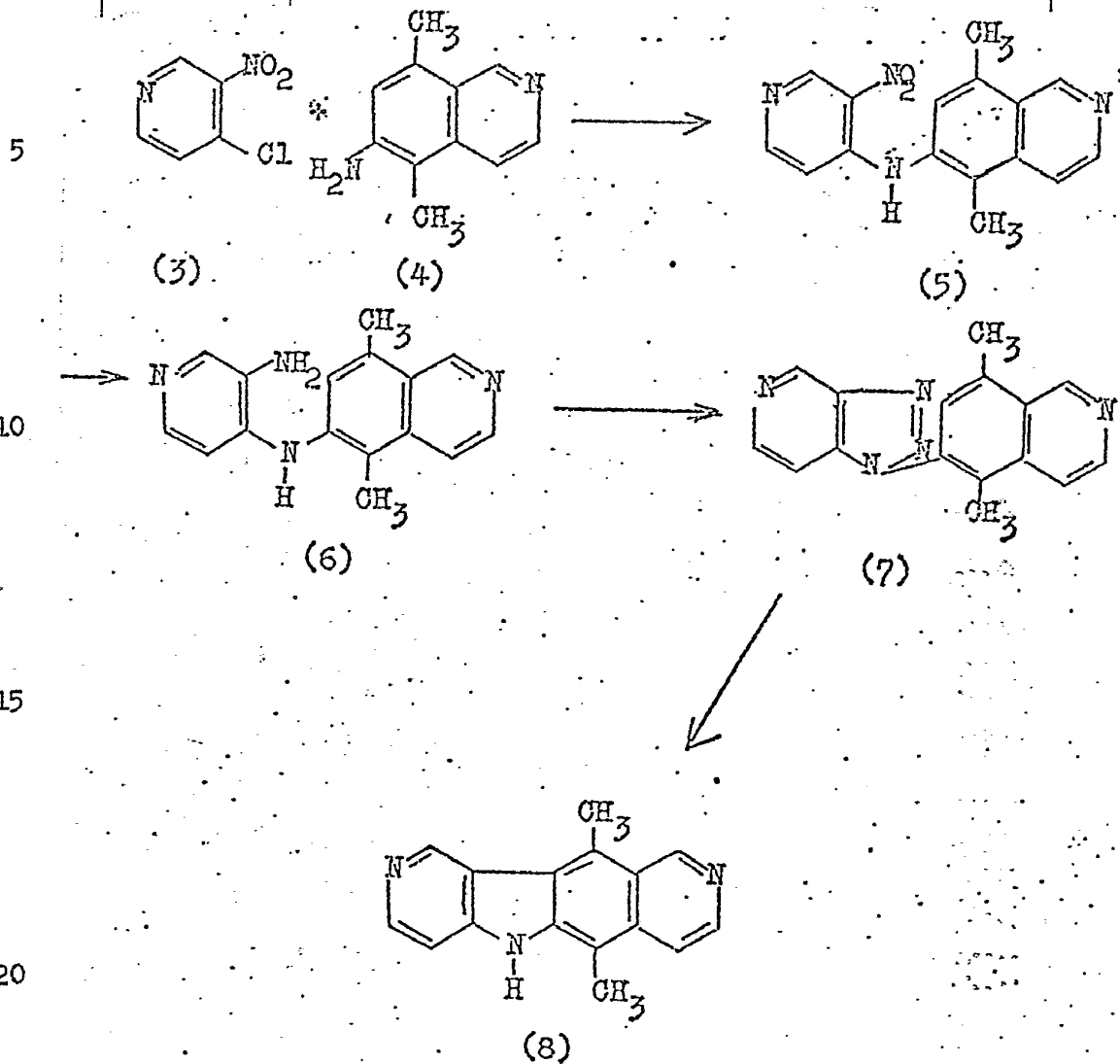
20 Para formar esas sales aceptables en farmacia es
importante utilizar los agentes apropiados bien conocidos
por el experto en la técnica, tales como los ácidos clorhí-
drico, bromhídrico, succínico, láctico, acético, fosfóri-
co, y cualquier otro ácido comúnmente utilizado para for-
mar tales sales.

Se indicarán a continuación los esquemas de reac-
ción de los modos de operación preferidos para la realiza-
ción del procedimiento según la invención.

25 Modo de operación nº 1:

Este modo de operación se refiere a la obtención
de dipirido-indoles de la anterior fórmula II, en la que
R'₁ es hidrógeno y R'₂ es un grupo alcohilo, por ejemplo
el grupo metilo; este modo de operación está representado
30 por el esquema siguiente, para el compuesto de fórmula II

1 en la que R'_2 es un grupo metilo:



25

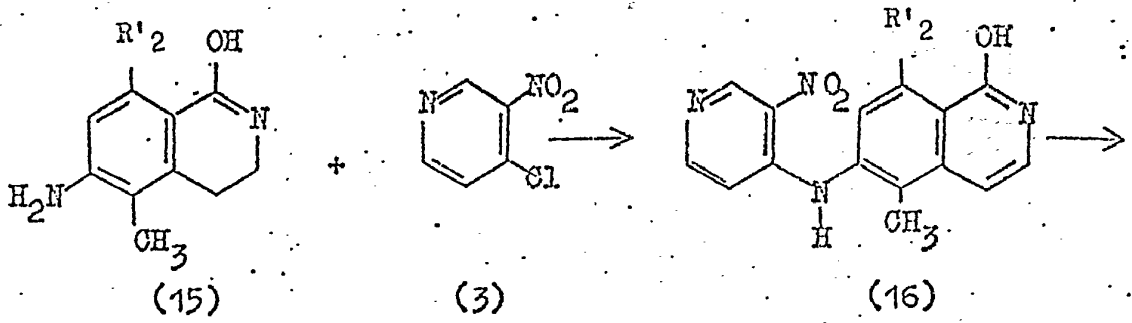
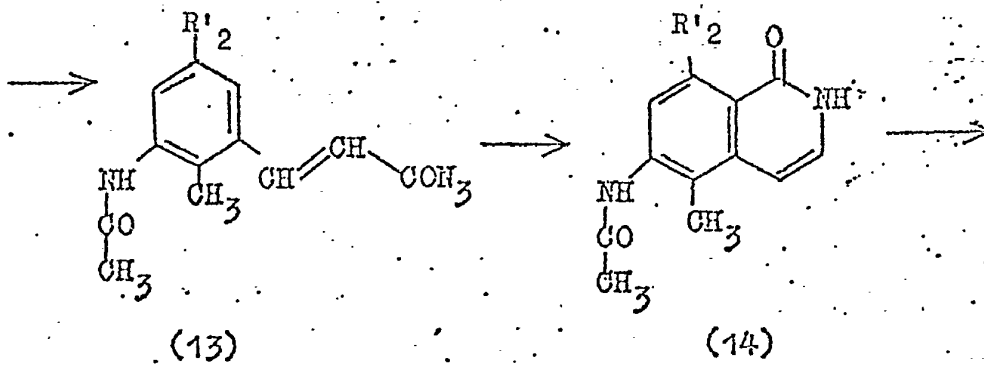
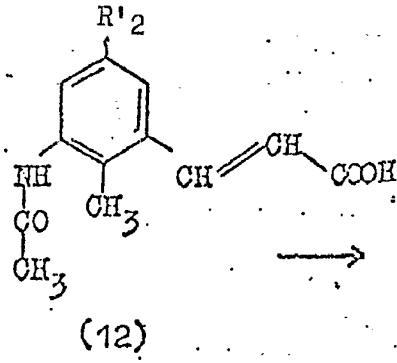
Este modo de operación será ilustrado por los ejemplos 1 a 4 más adelante.

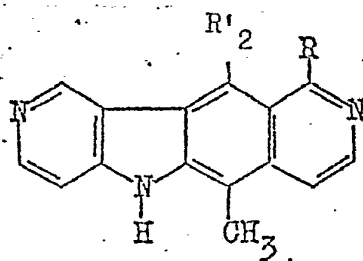
Modo de operación nº 2

30

Este modo de operación se refiere a la obtención de dipirido-indoles de la anterior fórmula II, en la que R'_1 es el grupo hidroxí y R'_2 es hidrógeno o un grupo alco

hilo inferior;





(XIX)

10 Los compuestos 19 a 26, descritos más adelante en los ejemplos ilustrativos, han sido sintetizados según este modo de operación; en los compuestos 19 a 25, $R'_2 = H$ y R es como se define a continuación:

compuesto 19 $R = OH$

15 Compuesto 20 $R = Cl$

compuesto 21 $R = NH-CH_2-CH_2-CH_2-N$

20 compuesto 22 $R = NH-CH_2-CH_2-CH_2-N$

compuesto 23 $R = NH-CH_2-CH_2-N$

25

compuesto 24 $R = NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(C_2H_5)_2$

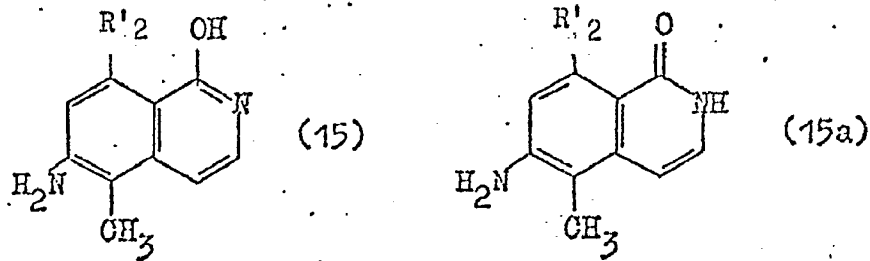
compuesto 25 $R = NH-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$

En el compuesto 26 $R'_2 = CH_3$
y $R = OH$

1

Según este modo de operación se puede preparar el producto de fórmula 15, que es un compuesto de partida según el procedimiento de la invención, y que se puede presentar en la forma tautómera (15a):

5



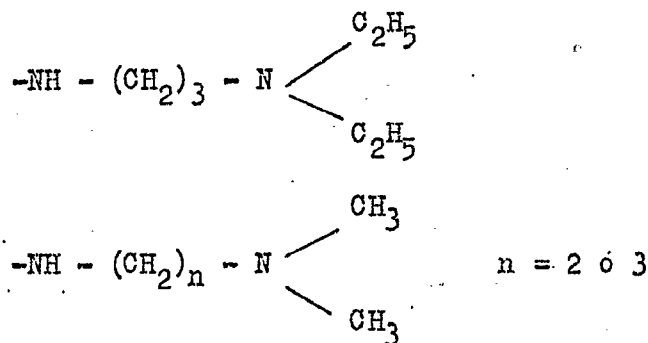
10

15

20

a partir del ácido cinámico de fórmula (12), por el procedimiento que consiste en formar primero la azida (13) correspondiente; efectuar luego una ciclización para formar la isoquinolona correspondiente, y eliminar por último el grupo protector del grupo amino, para obtener la metil-5-amino-6-isoquinolona de fórmula (15). Luego se trabaja según el procedimiento antes definido, para obtener el compuesto según la invención de fórmula XIX, en la que R es el grupo hidroxilo (compuesto 19). Después se puede sustituir el grupo hidroxilo de este compuesto por un átomo de cloro, un grupo amino, tales como, por ejemplo, los grupos de la fórmula siguiente, para obtener los compuestos 19 a 26:

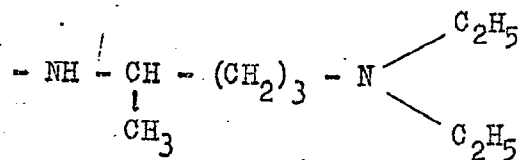
25



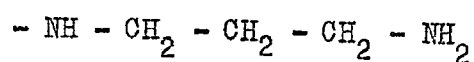
30

02058

1

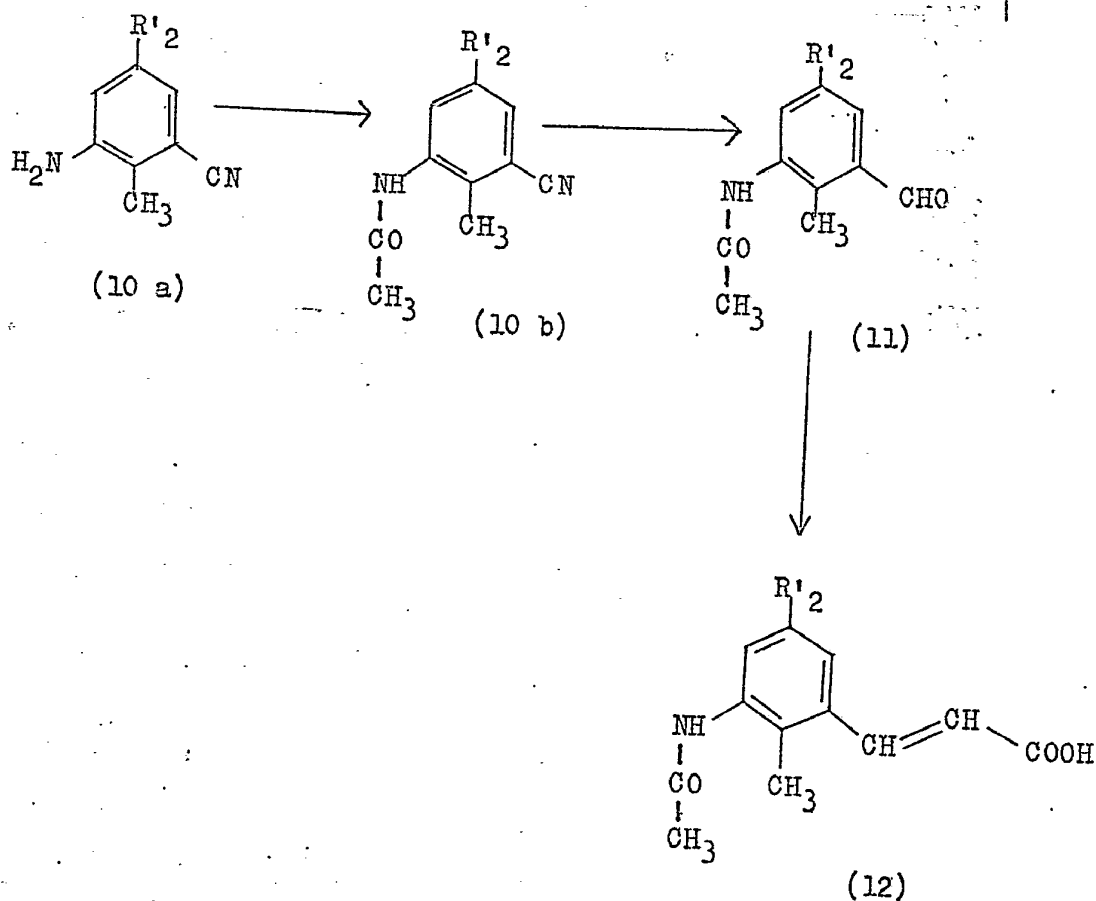


5



El ácido cinámico de fórmula (12), utilizado como producto de partida en el modo de operación nº 2 antes definido, se puede obtener de diferentes maneras. A continuación se indicarán tres modos de operación convenientes para la obtención del ácido cinámico de fórmula (12) (modos de operación (a) a (c)).

Modo de operación (a)

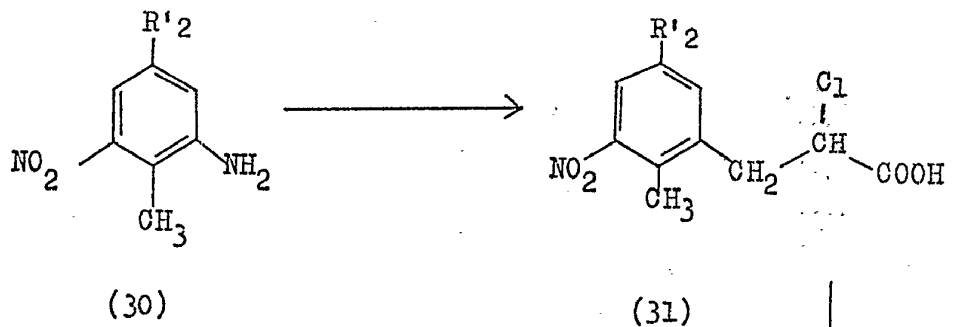


1. Siendo R'_2 tal como se ha definido antes.

Según este modo de operación, el ácido cinámico de fórmula (12) se obtiene a partir de metil-2-amino-3-benzonitrilo, de fórmula (10a), por el procedimiento que consiste en transformar el grupo amino de este compuesto en el grupo acetilamino, para formar el compuesto de fórmula (10b); transformar luego el grupo ciano del metil-2-acetilamino-3-benzonitrilo en el grupo aldehído, para formar el compuesto de fórmula (11), y condensar luego el grupo aldehído de este último compuesto con ácido malónico, para formar el ácido cinámico de fórmula (12). Este modo de operación se ilustra por el ejemplo 5 más adelante.

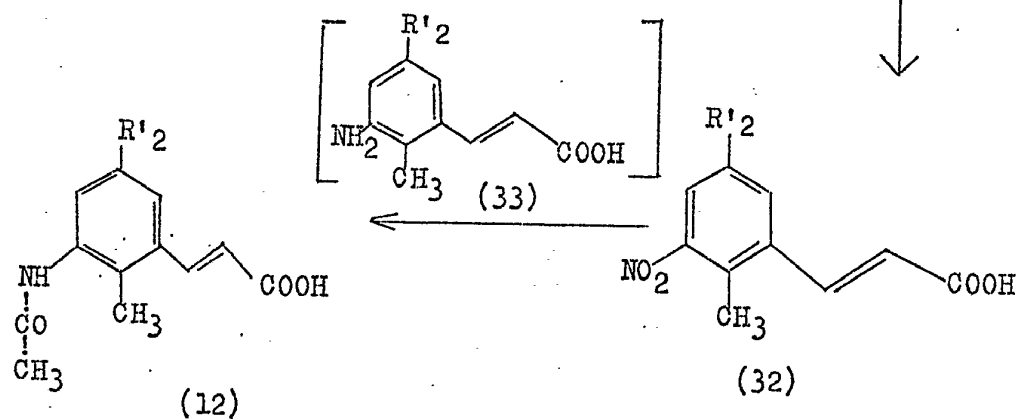
Modo de operación (b)

15



20

25



30

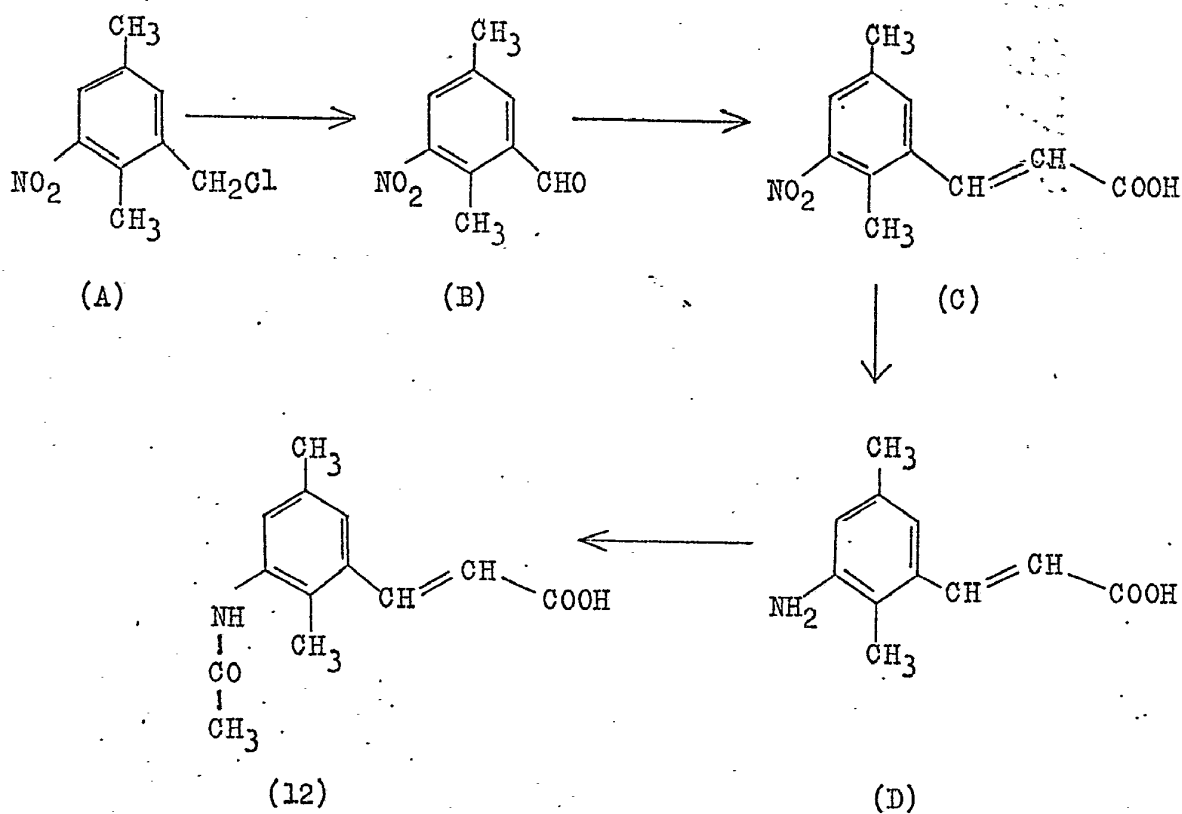
02058

1 Siendo R'_2 tal como se ha definido antes.

Este modo de operación consiste en transformar la metil-2-nitro-3-anilina de fórmula (30) en el ácido (metil-2-nitro-3-fenil)-cloropropiónico de fórmula (31),
 5 transformar este último compuesto al ácido metil-2-nitro-3-cinámico de fórmula (32), por eliminación de HCl, y transformar luego el grupo nitro de este compuesto en el grupo acetilamino, pasando por la etapa del grupo amino (fórmula 33), para formar el compuesto de fórmula (12).
 10 Este modo de operación será ilustrado por el ejemplo 13 más adelante.

Modo de operación (c)

Este modo de operación es conveniente para la obtención del compuesto de fórmula (12) en la que R'_2 es $-CH_3$.
 15



1 Este modo de operación consiste en transformar
el grupo clorometilo del compuesto de fórmula (A) en un
grupo aldehído (compuesto de fórmula (B)), condensar luego
este grupo aldehído con ácido malónico para formar el áci-
5 do cinámico de fórmula (C), reducir luego el grupo nitro
del compuesto de fórmula (C) a un grupo amino (compuesto
de fórmula (D)), que se transforma luego en un grupo ace-
tilamino para obtener el compuesto de fórmula (12). Este
modo de operación será ilustrado por el ejemplo 12 más
10 adelante.

La invención se refiere también a procedimientos
para la obtención de los compuestos intermedios convenien-
tes para la puesta en práctica del procedimiento de la in-
vención.

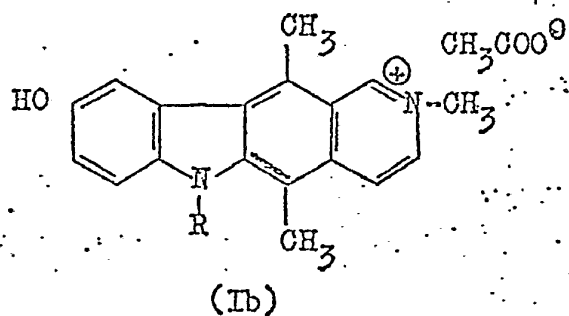
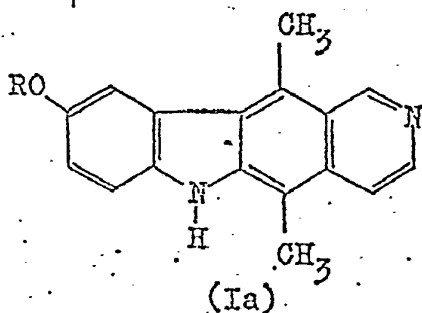
15 Entre los compuestos obtenidos según el procedi-
miento de la presente invención, se pueden citar muy parti-
cularmente los siguientes:

- dimetil-5,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol;
- diacetato de tetrametil-2,5,9,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indolinio;
- 20 - acetato de dimetil-5,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol;
- diclorhidrato de dimetil-5,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol;
- 25 - dihidro-1,2-oxo-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol;
- cloro-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol;
- (γ -dietilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol;
- 30 - (γ -dimetilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido

- 1 - [4,3-b][3,4-f] indol;
 - (β -dimetilaminoetil)-amino-1-metil-5-dipirido
 [4,3-b][3,4-f] indol;
 - [(α -metil- δ -dietilaminobutil)-amino]-1-metil-5-
 5 -dipirido [4,3-b][3,4-f] indol;
 - [(γ -aminopropil)-amino]-1-metil-5-dipirido [4,3-b]
 [3,4-f] indol;
 - dihidro-1,2-oxo-1-dimetil-5,11-dipirido [4,3-b]
 [3,4-f] indol.

10 Los compuestos de fórmula II obtenidos según el
 procedimiento de la invención se pueden utilizar a título
 de ingredientes activos en composiciones farmacéuticas an-
 tivirales y antitumorales, en combinación con un vehículo
 farmacéuticamente inerte. Estas composiciones farmacéuticas
 15 contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de los com-
 puestos de fórmula II. Estas composiciones farmacéuticas
 se pueden presentar, sobre todo, en forma de soluciones in-
 yectables por vía intravenosa o intramuscular.

20 Es sabido que la 9-metoxielipticina, su derivado
 O-desmetilado y, sobre todo, el acetato de 2-N-metil-9-hi-
 droxielipticinio, presentan propiedades terapéuticas inte-
 resantes en el campo de la cancerología; estos compuestos
 son pirido[4,3-b]carbazoles de fórmula general I_a y I_b:



1 en las que R representa CH₃ o H.

En este aspecto se puede hacer referencia a los artículos:

- 5 - J. B. LE PECQ, C. GOSSE, NGUYEN DAT XUONG, S. CROS y
C PAOLETTI: Cancer Research 36, págs. 3067-3076 (1976) y
- J. B. LE PECQ, C. GOSSE, NGUYEN DAT XUONG y C. PAOLETTI:
C. R. Acad. Sci. Paris, serie D 281, pág. 1365 (1975).

Se ha hallado ahora que los dipirido [4,3-b]
[3,4-f] indoles obtenidos según el procedimiento de la
10 invención presentan igualmente propiedades terapéuticas in-
teresantes en el campo de la cancerología.

Se han determinado las propiedades antitumorales
de los compuestos obtenidos según el procedimiento de la
invención, por su acción curativa sobre la leucemia expe-
15 rimental L-1210 trasplantada. Esta leucemia ha permitido,
en efecto, seleccionar numerosos compuestos activos y uti-
lizados en clínica humana (ZUBROD C.G., Proc.Nat.Acad.Sci.
1972, 69, 1042-1047, y SCHEPARZ SA SCREENING, 1971, CANCER
Chemother.Rep. parte 3, vol. 2, pág. 3).

20 Esta leucemia se mantiene en forma ascítica por
paso (vía I.P.) por ratones CBD1 (C57 B16 x DBA/2)F1. Las
preparaciones a ensayar se inyectan por vía intraperito-
neal al menos 1 día después del trasplante de las células
(1 sola inyección). Los resultados se expresan en tanto
25 por ciento de aumento del tiempo de supervivencia (ILS %)
según KESSEL y otros, Cancer Res. 1971, 31, 1883-1887), o
también en tanto por ciento del número de células destruí-
das por el producto (la supervivencia de los animales es
proporcional al número de células inyectadas).

30 También se ha investigado el poder protector de

1 los compuestos según la invención sobre la leucemia inducida por virus, de Friend (J. Exp. Med. 1957 105, 307-318), y se ha determinado que los compuestos según la invención son agentes antivirales y antitumorales.

5 El estudio del desarrollo del sarcoma inducido por virus, de MOLONEY (Nat. Cancer. Inst. Monograph 22, 139-142, 1966), ha permitido determinar igualmente que los compuestos según la invención son agentes antivirales y antitumorales.

10 Se han determinado igualmente la dosis tóxica y la toxicidad aguda en vivo, es decir, las dosis letales DL 100 y DL 50.

15 Por otra parte, se ha mostrado que los compuestos según la invención son citotóxicos a concentraciones comprendidas entre 0,2 y 10 μ M, y que el compuesto 21 según la invención es tan activo o más que algunos productos utilizados como antitumorales.

20 La invención se ilustrará ahora por los ejemplos no limitativos siguientes. Todas las temperaturas se dan en grados centígrados.

EJEMPLO 1

Preparación de dimetil-5,11-dipirido [4,3-b][3,4-f]indol (compuesto de fórmula 8)

25 A - Dimetil-5,8-[(nitro-3'-piridil)-4'-amino]-6-isoquinoleína de fórmula (5)

30 Se han disuelto 36 g de dimetil-5,8-amino-6-isoquinoleína de fórmula (4) en 1,5 l de dimetoxi-1,2-etano; se han añadido 33,14 g de nitro-3-cloro-4-piridina de fórmula (3), y luego 95,85 ml de una solución de ácido clorhídrico seco en éter, con título de 4,362 M (2 equivalentes

1 molares en relación a la aminoisoquinoleína de fórmula (3)).

Tras 192 horas de calentamiento a reflujo se ha evaporado el disolvente, se ha recogido el residuo en 1,5 l de agua, agitando 1 h, y el precipitado insoluble ha sido filtrado con succión, dando 1,7 g de nitro-3-hidroxi-4-
5 -piridina.

Controlando constantemente con medidor de pH, se ha añadido carbonato potásico progresivamente a la fase acuosa, y el precipitado que aparece a partir de pH 4 ha sido filtrado con succión cuando se ha alcanzado el pH 5,5.
10 Tras secado, éste ha sido recristalizado con benceno, y así se han obtenido 17,6 g, o sea 28,6%, de microcristales amarillos, punto de fusión: 206°C, correspondiente al compuesto esperado.

15 Análisis:

	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₃	C	H	N
Calculado %:		65,29	4,80	19,04
Hallado%:		65,09	4,81	18,86

Alcalinizando las aguas madres hasta pH 10 se han recuperado luego 13 g, o sea 36%, de la aminoisoquinoleína de fórmula (4); punto de fusión: 149°C tras cristalización.
20

B - Dimetil-5,8-((amino-3'-piridil)-4'-amino)-6-isoquinoleína de fórmula (6)

25 Se han disuelto 20 g del derivado nitrado de fórmula (5) en 1 litro de etanol absoluto, se han añadido 2 g de carbón paladiado al 10%, y el conjunto ha sido agitado bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura y presión ambientes, hasta absorción de la cantidad teórica de hidrógeno. Tras filtración del catalizador, el disolvente ha si
30

1 do evaporado y el residuo se ha recristalizado en etanol, dando 16,9 g (93,7%) de cristales beige, punto de fusión = 235 - 250°C con descomposición, correspondiente al compuesto esperado cristalizado con 1/2 mol de etanol.

5

Análisis:

$C_{16}H_{16}N_4, 1/2C_2H_5OH$	C	H	N
Calculado %	71,05	6,66	19,50
Hallado %	70,78	6,77	19,18

10

C - [dimetil-5',8'-isoquinolil]-6'7-1-triazolo [4,5-c] piridina de fórmula (7)

15

Se han disuelto 16,8 g de la amina de fórmula (6) en 300 ml de ácido acético, enfriado a aproximadamente 0°C, y se le han añadido progresivamente, gota a gota y manteniendo en frío, 4,83 g de nitrito sódico disuelto en 150 ml de agua. Se ha mantenido la mezcla de reacción bajo agitación en frío durante 2 h, y luego 1 h dejándola volver a temperatura ambiente; se ha evaporado el disolvente, recogido el residuo en 300 ml de agua y filtrado el precipitado insoluble.

20

Tras recristalización con etanol, se han formado así 14,8 g, o sea 84,5%, de cristales amarillos claros, punto de fusión 215-220°C, correspondiente al producto esperado.

Análisis:

25

$C_{16}H_{13}N_5$	C	H	N
Calculado %:	69,80	4,76	25,44
Hallado% :	69,67	4,77	25,23

D- Dimetil-5,11-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol de fórmula (8).

30

Se han mezclado 12 g de la triazolopiridina de

1 fórmula (7) con 39 g de parafina de punto de fusión 54-56°C, y el conjunto ha sido calentado en atmósfera de nitrógeno hasta que cesa el desprendimiento gaseoso, o sea durante 20 a 25 minutos.

5 Tras haber dejado enfriar la mezcla de reacción se han añadido 100 ml de éter de petróleo pesado (punto de ebullición a presión normal: 100-140°C), se ha calentado hasta ebullición y se ha filtrado con succión el sólido negro insoluble. Este último ha sido recogido en etanol en presencia de carbón animal, se ha filtrado, concentrado y filtrado en frío, y luego se ha recristalizado con piridina, dando 5,4 g (40,6%) de microcristales amarillos, infusibles a 350°C.

10

<u>Análisis:</u>	$C_{16}H_{13}N_3$	C	H	N
15	Calculado %:	77,71	5,30	16,99
	Hallado % :	77,52	5,32	16,98

EJEMPLO 2

Preparación del diacetato de tetrametil-2,5,9,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indolinio de fórmula IX (X = CH₃COO).

20 274 mg del compuesto de fórmula (8) obtenido según el ejemplo 1, han sido puestos en suspensión en 750 ml de acetona, y calentados a reflujo durante 6 h en presencia de un gran exceso de yoduro de metilo (1,42 g). Tras adición de la misma cantidad de yoduro de metilo, se ha

25 calentado de nuevo a reflujo durante 14 h; se ha enfriado luego la mezcla de reacción y se han filtrado con succión 487 mg (92%) del producto insoluble, correspondiente al diyoduro (compuesto de fórmula (IX) en la que X = I).

30

<u>Análisis:</u>	$C_{18}H_{19}I_2N_3$	C	H	N
	Calculado %	40,68	3,58	7,91
	Hallado %	40,55	3,67	7,88

1 450 mg del compuesto antes obtenido, disueltos
 en 100 ml de agua, han sido pasados por una columna de re-
 sina intercambiadora (DOWEX LX2) cargada de iones acetato,
 y se ha evaporado el disolvente. El residuo ha sido recogido
 5 do en alcohol isobutílico, dando el producto esperado en
 forma de microcristales amarillo-anaranjados, de punto de
 fusión 230-235°C. Ha dado una sola mancha por cromatografía
 en capa delgada con alúmina, con mezcla metanol-agua (4/1
 v/v) como eluyente; el espectro de resonancia magnética nu-
 clear (RMN) indica que se trata en efecto del compuesto es-
 10 perado, pero su análisis centesimal corresponde al producto
 deseado parcialmente hidratado.

EJEMPLO 3

Preparación del acetato de dimetil-5,11-dipirido [4,3-b]
 15 [3,4-f] indol

1 g del compuesto de fórmula (8) obtenido según
 el ejemplo 1, y 20 ml de ácido acético, han sido calentados
 a ebullición y se ha evaporado enseguida el exceso de áci-
 do acético. El residuo, recogido en acetona y filtrado, ha
 20 suministrado 1 g de precipitado insoluble, en forma de mi-
 crocristales ocre amarillos, infusibles a 310°C, y corres-
 pondientes al monohidrato del compuesto buscado.

<u>Análisis:</u>	$C_{18}H_{19}N_3O_3$	C	H	N
	Calculado %:	66,44	5,89	12,92
	Hallado %:	66,58	5,83	12,79

EJEMPLO 4

Diclorhidrato de dimetil-5,11-dipirido [4,3-b][3,4-f]
 25 indol

Se han disuelto 200 mg de la base de fórmula (8)
 obtenida según el ejemplo 1, en 20 ml de etanol absoluto,

1 y se ha añadido 1 ml de etanol saturado de ácido clorhídri-
co y se ha evaporado el disolvente al baño maría, a presión
reducida. El residuo ha sido recogido en acetona y filtrado
con succión, suministrando 200 mg de microcristales ocre,
5 infusibles a 310°C y correspondientes al monohidrato del
diclorhidrato buscado.

<u>Análisis:</u> $C_{16}H_{17}Cl_2N_3O$	C	H	Cl	N
Calculado %:	56,80	5,02	21,01	12,43
Hallado %:	56,34	4,78	21,20	12,56

10 EJEMPLO 5

Preparación de dihidro-1,2-oxo-1-metil-5-dipirido [4,3-b]
[3,4-f] indol (compuesto 19)

A) Metil-2-acetilamino-3-benzaldehído de fórmula (11)

15 Se han disuelto 39 g (0,3 moles) de metil-2-amino-3-benzonitrilo en 75 ml de ácido acético, se han añadido 30 ml (0,3 moles) de anhídrido acético, se ha calentado a reflujo durante 5 minutos, y se ha enfriado. El sólido obtenido ha sido filtrado con succión, y la evaporación del disolvente ha suministrado una nueva cantidad de sólido, que se ha unido al precedente. Tras recristalización del conjunto con tolueno, se han obtenido 44 g (95%) de pajillas incoloras, de un punto de fusión de 160°C.

20

<u>Análisis:</u> $C_{10}H_{10}N_2O$	C	H	N
Calculado %:	68,95	5,79	16,08
Hallado %:	68,82	5,83	15,99

25 B) Acido metil-2-acetilamino-3-cinámico de fórmula (12)

30 En un matraz de tres bocas, de 6 l, se han introducido 60 g (0,34 moles) del nitrilo de fórmula (10) y 1 litro de ácido fórmico diluído al 50% en agua, y luego se ha calentado a ebullición. Manteniendo el conjunto

1 a reflujo se han añadido en 5 veces, a intervalos de 30 minutos, 120 g de aléación Raney, se ha dejado 30 minutos más a reflujo, y se han filtrado las sales y el exceso de reactivo insolubles.

5 El precipitado se ha lavado con agua caliente, y el conjunto del filtrado ha sido sometido a extracción con ayuda de cloroformo, al menos diez veces, con 500 ml de cloroformo cada vez.

10 La evaporación de la fase orgánica ha suministrado un residuo que ha destilado dando 39 g de un producto (eb. $t_b = 210-225^{\circ}\text{C}$) correspondiente a la mezcla del nitrilo de partida y el aldehído de fórmula (11), es decir, metil-2-acetilamino-3-benzaldehído. Si se recristaliza en benceno o tolueno, se obtienen finas agujas incoloras, punto de fusión $124-128^{\circ}\text{C}$.

15

<u>Análisis:</u>	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	C	H	N
Calculado %:		67,78	6,26	7,91
Hallado %:		68,07	6,27	8,05

20 La mezcla precedente (38 g), bruto de destilación, ha sido disuelta en 50 ml de piridina seca; se ha añadido de una sola vez a una solución de 300 ml de piridina que contiene 22,5 g de ácido malónico y 1 ml de piperidina, y el conjunto ha sido calentado a reflujo durante 1h 30. La piridina ha sido evaporada a presión reducida, y el residuo ha sido tratado con una solución de sosa en exceso, en presencia de cloroformo.

25 Tras decantación, la evaporación del cloroformo ha suministrado un residuo constituido por una fracción de nitrilo de partida, de fórmula (10).

La acidificación de la capa alcalina con ácido

1 clorhídrico ha suministrado el ácido acrílico de fórmula
 (12), que se ha recristalizado en ácido acético, dando 25
 g (34% en relación a la cantidad de nitrilo de fórmula (10)
 utilizada) de pajillas incoloras, punto de fusión = 265-
 5 267°C.

<u>Análisis:</u>	$C_{12}H_{13}NO_2$	C	H	N
Calculado %:		65,74	5,98	6,39
Hallado % :		65,58	6,12	6,52

C) Metil-2-acetilamino-3-cinamoilazida de fórmula (13)

10 El ácido acrílico de fórmula (12) (36 g) ha sido
 añadido a una solución de 17 g de trietilamina en 150 ml
 de acetona, y la totalidad ha sido enfriada a 0°C. Mante-
 niendo la temperatura por debajo de 0°C se ha añadido gota
 a gota una solución de 24,3 g de cloroformiato de etilo en
 15 150 ml de acetona; se ha agitado la mezcla a 0°C durante
 1 hora, y luego se ha añadido progresivamente la solución
 formada a partir de 16 g de nitrohidrato sódico y 40 ml
 de agua. Se ha agitado todavía en frío la mezcla de reac-
 ción, durante 1 hora tras el final de la adición, y se han
 20 filtrado con succión 27,8 g, o sea 71%, de un sólido inco-
 loro correspondiente a la azida buscada, que se descompone
 por fusión a partir de 150°C. La evaporación de la acetona
 de las aguas madres, al baño maría a presión reducida, y
 no sobrepasando 30°C, ha suministrado una nueva cantidad
 25 del compuesto esperado, que ahora está coloreado de amari-
 llo. Este producto ha sido utilizado para la continuación
 de la síntesis, sin otra purificación.

D) Hidroxi-1-metil-5-acetilamino-6-isoquinoleína o metil-5-
 -acetilamino-6-isoquinolona-1, de fórmula (14)

30 La mezcla constituida por 1,5 l de éter difení-

1 lico y 33 g de tributilamina ha sido calentada a 240°C en un matraz de tres bocas, de 4 l. Se han puesto 41 g de la azida de fórmula (13), previamente secada en desecador bajo vacío, en suspensión en 300 ml de éter difenílico, y se le ha añadido a la solución precedente, mantenida bajo violenta agitación, en pequeñas porciones pero lo más rápidamente posible, y continuando el calentamiento para evitar que la temperatura descienda por debajo de 220°C.

5
10 Tras el final de la adición se ha calentado de nuevo a 240°C y se ha mantenido la mezcla de reacción a esta temperatura durante 10 minutos, y luego se ha dejado enfriar. El precipitado formado ha sido filtrado, lavado con benceno y recristalizado en etanol, en el que es muy poco soluble; dando 25 g, o sea 69%, de microcristales incoloros, infusibles a 320°C.

15

<u>Análisis:</u>	C	H	N
$C_{12}H_{12}N_2O_2$			
Calculado % :	66,65	5,59	12,96
Hallado %:	66,98	5,64	12,87

E) Metil-5-amino-6-isoquinolona-1 de fórmula (15)

20 La mezcla formada por 500 ml de etanol, 100 ml de ácido clorhídrico y 25 g del compuesto de fórmula (14) ha sido calentada a reflujo durante 2h 30. La evaporación del disolvente ha suministrado un residuo que se ha recogido en agua caliente, se ha filtrado, y la alcalinización del filtrado con sosa N ha suministrado 16,3 g, o sea 81%, de un compuesto que ha recristalizado en forma de agujas incoloras, punto de fusión = 260 - 285°C con descomposición.

1	<u>Análisis:</u>	$C_{10}H_{10}N_2O$	C	H	N
	Calculado %		68,95	5,79	16,08
	Hallado %		68,97	5,83	15,85

F) Metil-5- γ -(nitro-3'-piridil)-4'-amino- γ -6-isoquinolona-
 5 -1 de fórmula (16)

Se han disuelto 17,4 g del compuesto de fórmula (15) en 400 ml de dimetilformamida (DMF); se ha añadido una solución de 15,9 g de cloronitropiridina de fórmula (3), en 100 ml de DMF, y esta mezcla se ha dejado a temperatura ambiente durante 12 días. El precipitado formado ha sido filtrado con succión; la evaporación del disolvente a presión reducida ha vuelto a dar una nueva cantidad de sólido, y el conjunto de este último ha sido recogido en agua caliente, y luego ha sido alcalinizado con sosa N. El precipitado formado ha recristalizado con DMF, dando 21,3 g (72%) de prismas amarillos infusibles a 330°C, y correspondientes al compuesto de fórmula 16.

15	<u>Análisis:</u>	$C_{15}H_{12}N_4O_3$	C	H	N
	Calculado %:		60,80	4,03	18,91
20	Hallado %:		60,46	4,08	18,62

Quando la reacción ha sido efectuada en presencia de un exceso de 1 a 3% de nitro-3-cloro-4-piridina, de fórmula (3), a la vez que el producto antes descrito se ha aislado de 10 a 15% de un producto secundario, menos soluble en DMF, y que ha recristalizado en este disolvente en prismas rojos, infusibles a 330°C. Corresponde a la nitro-3-amino-4-di- γ -N-1,N-4-(hidroxi-1'-metil-5'-isoquinolil-6'0-piridina γ .

1	<u>Análisis:</u>	$C_{25}H_{19}N_5O_4, 1/2 H_2O$	C	H	N
		Calculado %:	64,95	4,35	14,38
		Hallado %:	64,72	4,19	14,28

5 G) Metil-5- \int (amino-3'-piridil)-4'-amino \int -6-isoquinolona de fórmula (17)

10 Se han disuelto 12,6 g del derivado nitrado precedente en 500 ml de ácido acético; se han añadido 0,6 g de carbono paladiado al 10%, y se ha agitado en atmósfera de hidrógeno hasta absorción de la cantidad teórica de hidrógeno. Se han añadido 500 ml de ácido acético, se ha calentado para disolver el precipitado formado, se ha filtrado el catalizador y evaporado el disolvente, y se ha disuelto el residuo en agua. Tras alcalinización hasta pH 9, el precipitado ha sido filtrado y recristalizado en acetoneitrilo, dando 10,2 g (84,3%) de microcristales crema, correspondientes al hidrato de la amina de fórmula (17).

15

	<u>Análisis:</u>	$C_{15}H_{16}N_4O_2$	C	H	N
		Calculado %:	63,86	5,67	19,71
		Hallado %:	63,84	5,44	19,47

20 H) \int (Dihidro-1',2'-oxo-1'-metil-5'-isoquinolil)-6' \int -1-triazolo \int 4,5-c \int piridina de fórmula (18)

25 En un matraz de tres bocas, de 500 ml, provisto de termómetro, agitador mecánico y ampolla de bromo, se han mezclado 10,2 g de la amina de fórmula (17) y 70 ml de ácido acético; se ha enfriado la mezcla de reacción a aproximadamente 0°C, y se ha añadido progresivamente una solución de 3 g de nitrito sódico en el mínimo de agua. Se ha continuado la agitación durante 1 h, dejando volver la mezcla de reacción a la temperatura ambiente; luego se ha filtrado el precipitado, se ha lavado con agua y secado. Así

30

1 se han obtenido 8,3 g (83,5%) de microcristales incoloros; punto de fusión 309-310°C, correspondiente al hidrato de la triazolopiridina de fórmula (18).

<u>Análisis:</u>	$C_{15}H_{15}N_5O_2$	C	H	N
5	Calculado %:	61,01	4,44	23,72
	Hallado %:	60,92	4,15	23,44

I) Dihidro-1,2-oxo-1-metil-5-dipirido [4,3-b][3,4-f]-indol de fórmula XIX con R = OH: compuesto 19

10 Se han añadido 8 g de triazolopiridina de fórmula (18) a 60 g de fenantreno fundido, y luego se ha calentado a 340°C y se ha mantenido la mezcla de reacción bajo agitación a esa temperatura durante 20 minutos, y luego se ha dejado enfriar. El fenantreno se ha extraído con éter de petróleo o hexano, y el residuo insoluble ha sido
15 recristalizado en DMF, dando 4,2 g (58%) de microcristales grises infusibles a 310°C, y correspondientes al hemihidrato del producto de fórmula (19).

<u>Análisis:</u>	$C_{15}H_{11}N_3O, 1/2H_2O$	C	H	N
20	Calculado %:	69,75	4,68	16,27
	Hallado %:	70,04	4,40	16,14

EJEMPLO 6

Cloro-1-metil-5-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol (compuesto de fórmula XIX con R = Cl: compuesto 20)

25 Se han mezclado 1,5 g del dipirido-indol (compuesto 19) con 250 ml de oxiclورو de fósforo que contiene 1,5 g de pentacloruro de fósforo, y se ha calentado a refluxo durante 20 horas. El exceso de oxiclورو y de pentacloruro ha sido eliminado al baño maría a presión reducida, y el residuo ha sido recogido en agua tibia, en varias
30 veces y agitando a cada vez durante 1 hora, hasta agota-

1 miento. Los filtrados acuosos reunidos y enfriados han si-
do neutralizados con una solución de carbonato sódico o
potásico, y el precipitado formado, filtrado con succión
y luego secado, ha sido recristalizado con DMF, dando 875
5 mg, o sea 54%, de microcristales amarillos infusibles a
320°C, y correspondientes al hemihidrato del derivado clo-
rado 20.

Análisis: $C_{15}H_{10}N_3Cl \cdot 1/2H_2O$ C H N Cl

Calculado %:	65,10	3,97	15,19	12,84
Hallado %:	64,77	3,92	14,97	13,21

10

EJEMPLO 7

(γ -dietilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol (compuesto de fórmula XIX con R =
-NH-CH₂-CH₂-CH₂-N<^{C₂H₅}), es decir, compuesto 21

15

La mezcla, constituida por 875 mg del derivado
clorado obtenido según el anterior ejemplo 6, y 10 g de
 γ -dietilaminopropilamina, ha sido calentada en baño de
aceite a 150°C durante 30 minutos, y el exceso de amina
ha sido eliminado al baño maría bajo presión reducida. El
20 residuo ha sido sometido tres veces a extracción con 60
ml de benceno a ebullición, y el residuo insoluble ha sido
recogido en cloroformo en presencia de sosa. Tras lavado
de la capa cloroformica con agua se ha evaporado el cloro-
formo y el residuo se ha recogido con el benceno antes uti-
25 lizado, y la totalidad se ha concentrado hasta aproxima-
mente 50 ml y enfriado. La filtración del sólido en sus-
pensión ha suministrado 180 mg (15%) de microcristales ama-
rillos, punto de fusión 215-218°C, correspondiente a la
amina esperada cristalizada con una molécula de agua.

30

02058

1	<u>Análisis:</u>	$C_{22}H_{27}N_5, H_2O$	C	H	N	
			Calculado %:	69,63	7,70	18,46
			Hallado %:	70,02	7,39	18,29

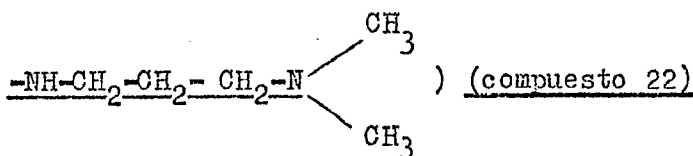
5 Se ha observado que trabajando con un exceso de γ -dietilaminopropilamina se puede mejorar el rendimiento. Según esta variante de realización, la mezcla, constituida por 4 g del derivado clorado obtenido según el anterior ejemplo 6, y 100 ml de γ -dietilaminopropilamina, ha sido calentada a reflujo durante 4 h, y el exceso de amina

10 ha sido eliminado a presión reducida. El residuo obtenido ha sido recogido en una solución de sosa N, y el precipitado formado, filtrado con succión y secado, ha sido recristalizado con xileno, dando 4,1 g (73%) del derivado esperado, que ha cristalizado con una molécula de agua.

15	<u>Análisis:</u>	$C_{22}H_{27}N_5, H_2O$	C	H	N	
			Calculado %:	69,63	7,70	18,45
			Hallado %:	69,82	7,49	18,33

EJEMPLO 8

20 (γ -dimetilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol (compuesto de fórmula XIX con R =



25 Se ha trabajado según el primer modo de operación descrito en el ejemplo 7, calentando a ebullición dimetilaminopropilamina durante 7 horas. Tras un tratamiento idéntico al antes mencionado, el producto se ha recristalizado con benceno, dando microcristales amarillos claros, punto de fusión 240°C, correspondiente al hemihidrato del producto esperado.

30

1	<u>Análisis:</u>	$C_{20}H_{23}N_5, 1/2 H_2O$	C	H	N
		Calculado %:	70,09	7,00	20,44
		Hallado %:	70,27	6,85	20,13

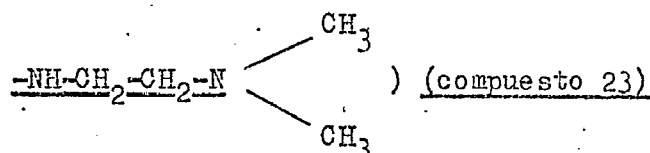
Trabajando según la variante de realización descrita en el anterior ejemplo 7 se ha obtenido un rendimiento del 73%. Así según esta variante se ha calentado a reflujo durante 4 horas el derivado clorado del ejemplo 6, con gran exceso de γ -dimetilaminopropilamina. Tras eliminación del exceso de amina a presión reducida, el producto ha sido recristalizado con benceno, y se ha obtenido 73% de microcristales cuyo punto de fusión era 240°C; este producto correspondía al hemihidrato del producto esperado.

Se ha disuelto 1 g del compuesto antes obtenido en 30 ml de etanol saturado de ácido clorhídrico, se ha calentado a ebullición y se ha enfriado enseguida. El precipitado formado ha sido recristalizado en etanol, y se ha obtenido 1 g de agujas incoloras, punto de fusión 266-268°C, correspondiente al triclorohidrato hidratado del anterior compuesto 22.

20	<u>Análisis:</u>	$C_{20}H_{23}N_5, 3 HCl, H_2O$	C	H	N	Cl
		Calculado %:	52,11	6,08	15,20	23,12
		Hallado %:	51,72	6,21	14,83	22,88

EJEMPLO 9

25 (β -dimetilaminoetil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol (compuesto de fórmula XIX con R =



1 7 y 8, calentando el compuesto clorado 20 en β -dimetilami-
noetilamina a ebullición, durante 15 h. Tras un tratamien-
to idéntico a los mencionados en los dos casos precedentes,
5 el producto ha sido recristalizado y recogido luego en eta-
nol clorhídrico, para formar el triclorhidrato correspon-
diente, el cual cristaliza con etanol en prismas incoloros,
punto de fusión 262-269°C, correspondiente al dihidrato del
triclorhidrato del compuesto 23 esperado. $C_{19}H_{21}N_5$. Rendi-
miento 37%.

10 Análisis: $C_{19}H_{21}N_5 \cdot 3HCl \cdot 2H_2O$

	C	H	N	Cl
Calculado %:	49,08	6,02	15,07	22,93
Hallado %:	49,58	5,77	14,52	23,26

EJEMPLO 10

15 \lceil (α -metil- δ -dietilaminobutil)-amino \lceil -1-metil-5-dipiri-
do \lceil 4,3-b \lceil 3,4-f \lceil indol (compuesto de fórmula XIX con
R = $\text{NH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ (compuesto 24)

20 500 mg del derivado clorado obtenido según el
anterior ejemplo 6 han sido puestos en 10 ml de amino-2-
-dietilamino-5-pentano, y el conjunto ha sido calentado a
reflujo de la amina durante 13 horas, bajo atmósfera de ni-
trógeno y al abrigo de la luz. Se ha eliminado el exceso
de la amina y se ha recogido el residuo en una solución
25 de sosa N. El precipitado formado ha sido filtrado con suc-
ción, lavado con agua, secado y recristalizado con tolueno,
dando 120 mg (17%) de microcristales amarillos, que funden
a aproximadamente 160°C.

1 Análisis: $C_{24}H_{31}N_5 \cdot H_2O = 405,5$

Calculado %: C 71,08 ; H 7,71 ; N 17,22

Hallado %: 70,78 7,94 17,59

EJEMPLO 11

5 [γ -aminopropil)-amino]-1-metil-5-dipirido [4,3-b]
[3,4-f] indol (compuesto de fórmula XIX con R =
NH-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, es decir, compuesto 25))

10 Se ha trabajado como en el ejemplo 7, con 400 mg del derivado clorado obtenido según el ejemplo 6 y 10 ml de diamino-1,3-propano, calentando a reflujo durante 1 hora. Se ha eliminado el exceso de diamino-1,3-propano, se ha recogido el residuo en una solución de sosa N, y se ha filtrado con succión el precipitado. Este último ha sido
15 recristalizado con dimetilformamida, dando 190 mg (42%) de microcristales amarillos claros, punto de fusión 268-269°C.

Análisis: $C_{18}H_{19}N_5 \cdot 0,33 H_2O = 311$

Calculado %: C 69,45 ; H 6,32 ; N 22,51

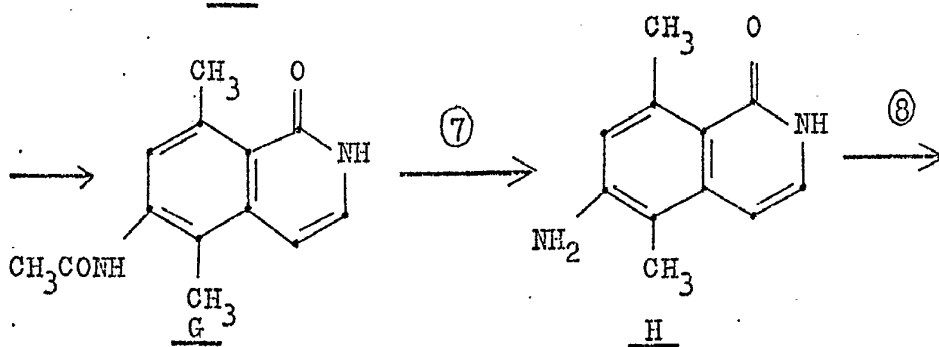
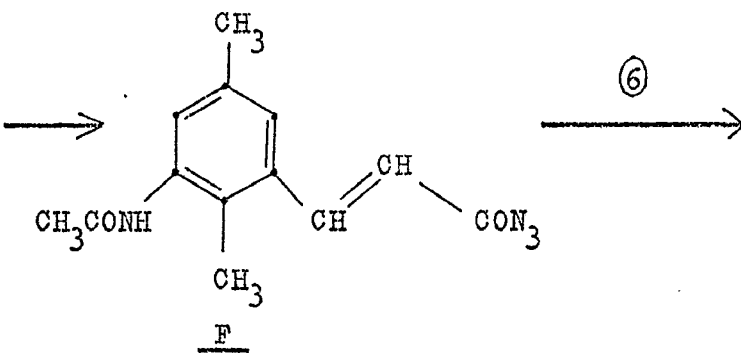
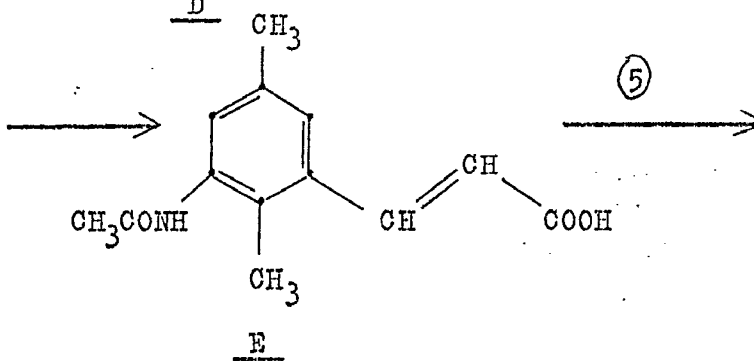
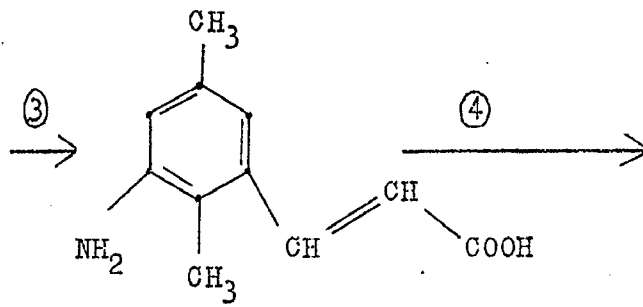
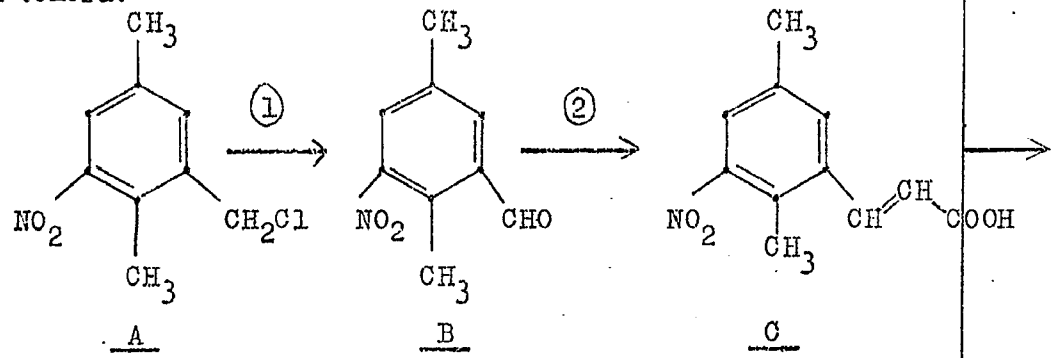
Hallado %: 69,33 6,50 22,45

20 EJEMPLO 12

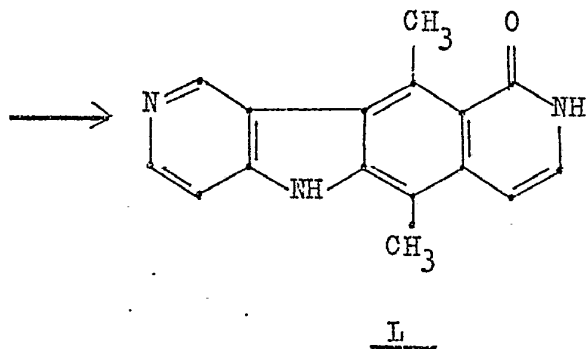
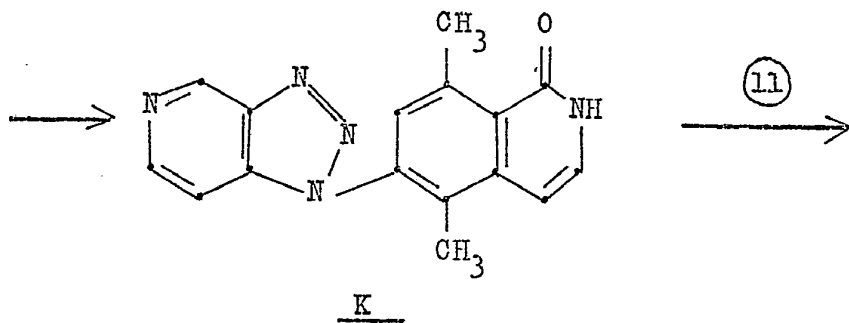
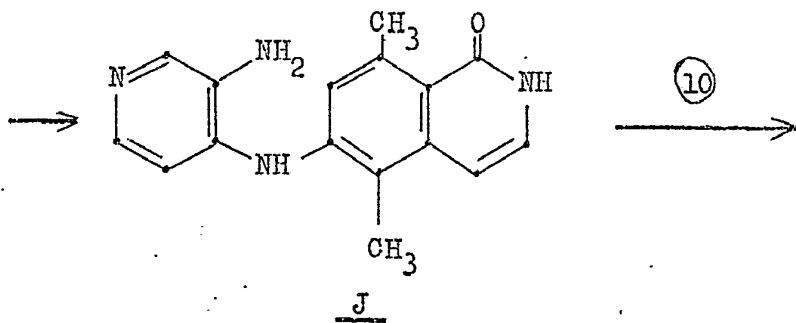
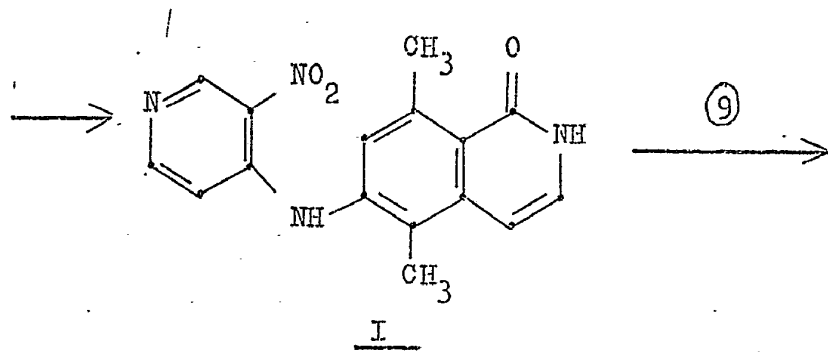
Preparación de dihidro-1,2-oxo-1-dimetil-5,11-dipirido
[4,3-b][3,4-f] indol (compuesto de fórmula I: compues-
to 26)

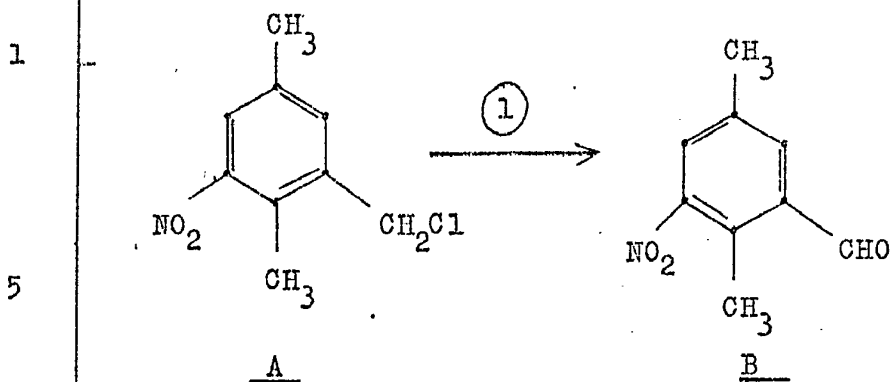
25 El esquema general de la síntesis de este compuesto se representa a continuación. Esta síntesis se realiza según el modo de operación (C), obteniéndose el compuesto de fórmula E (reacciones 1 a 4), que es compuesto particular de fórmula general (12), y según el modo de
30 operación nº 2 (reacciones 5 a 11). Los siguientes compuestos (g) a (L) se pueden presentar en su forma tau-

1 - tómera.



1





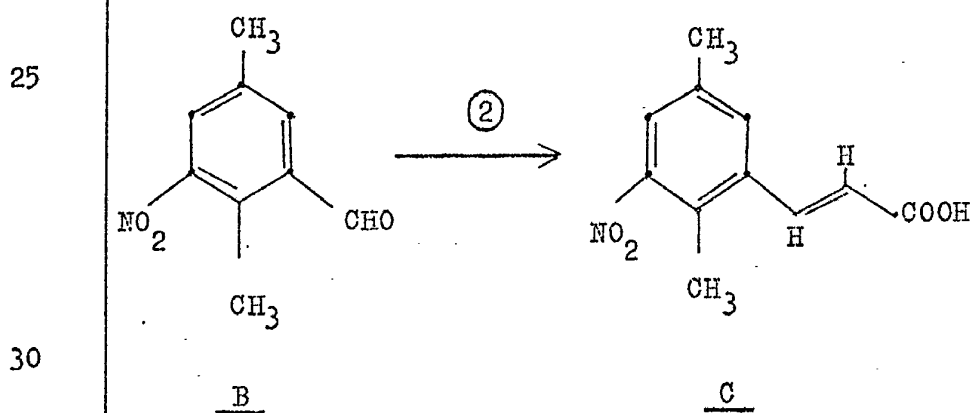
Dimetil-2,5-nitro-3-benzaldehido (B)

10 La mezcla constituida por dimetil-2,5-nitro-3-
-cloruro de bencilo, A, preparado según M.J. WINCHESTER y
F.D. POPP, J. Het. Chem. 12, pág. 547 (1975) (610 g), áci-
do acético (1280 ml), agua (1280 ml) y hexametilentetraami-
na (855 g) ha sido calentada a reflujo con agitación duran-
te 2 h. Luego se han añadido en 10 minutos 1037 ml de áci-
do clorhídrico concentrado, y se ha calentado de nuevo a
15 reflujo durante 20 minutos. Esta mezcla, enfriada a 0°C,
ha suministrado un sólido que se ha filtrado con succión,
secado y recristalizado con ciclohexano (4 litros), dando
290,5 g, o sea 53%, de agujas amarillas correspondientes
al aldehido de fórmula B, punto de fusión 90-93°C.
20

Análisis: $C_9H_9NO_3 = 179$

Calculado %: C 60,30 ; H 5,06 ; N 7,80

Hallado %: 60,13 4,97 7,71



02058

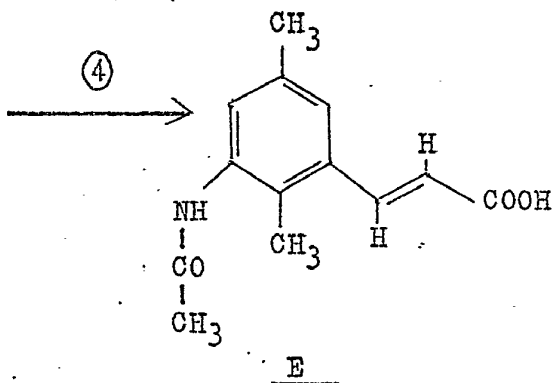
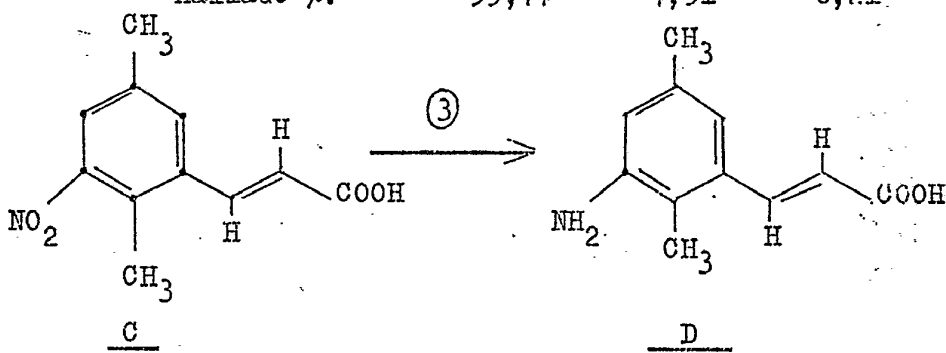
1 Acido dimetil-2,5-nitro-3-trans-cinnámico (C)

La mezcla constituida por 193,7 g del aldehido de fórmula B, 112,5 g de ácido malónico, 1,5 l de piridina secada con potasa, y 9 ml de piperidina, ha sido calentada a reflujo durante 24 h, pero añadiendo 2 veces 112,5 g de ácido malónico, respectivamente tras 3h 30 y 6 h de reflujo. Tras evaporación del disolvente, el residuo se ha recogido con acetona, se ha filtrado con succión, lavado con agua y de nuevo con acetona, dando el compuesto C puro, que ha sido cristalizado con etanol y ha dado microcristales ocrés, punto de fusión 228°C. Rendimiento: 173 g, o sea 72%.

Análisis: $C_{11}H_{11}NO_4 = 221,21$

Calculado %: C 59,72; H 5,01; N 6,33.

Hallado %: 59,74 4,91 6,21



1 Acido dimetil-2,5-acetilamino-3-trans-cinámico (E)

141 g del ácido nitrocinámico de fórmula C se han puesto en suspensión en 1260 ml de ácido acético, se han añadido a esta mezcla 170 g de níquel Raney lavado con ácido acético e hidrógeno, agitando el conjunto en atmósfera de hidrógeno a presión normal, hasta cese de la absorción de este último (se ha absorbido la cantidad teórica).

Se ha filtrado en caliente para eliminar el catalizador, y se ha evaporado la mitad del ácido acético.

10 Con una pequeña muestra se ha evaporado a sequedad, se ha recogido con agua, neutralizado con amoníaco, filtrado con succión y recristalizado con etanol, obteniendo microcristales incoloros correspondientes al ácido dimetil-2,5-amino-3-cinámico trans, de fórmula D, cuyo punto de fusión era 185°C.

15 Análisis: $C_{11}H_{13}NO_2$, $1/2 H_2O = 200,23$

Calculado %: C 65,98 ; H 7,05 ; N 7,00

Hallado %: 65,62 6,82 7,07

20 Al resto procedente de la evaporación de la mitad del ácido acético se han añadido 150 ml de anhídrido acético, se ha calentado a reflujo durante 1h 30, y luego se ha evaporado a sequedad. El residuo sólido ha sido recogido con agua clorhídrica, se ha agitado durante 1 h y filtrado con succión, dando un sólido que ha sido recristalizado con ácido acético, dando 126,2 g (84%) de pajillas incoloras, correspondientes al ácido de fórmula E, punto de fusión 270°C.

25 Análisis: $C_{13}H_{15}NO_3 = 233$

Calculado %: C 66,93 ; H 6,48 ; N 6,01

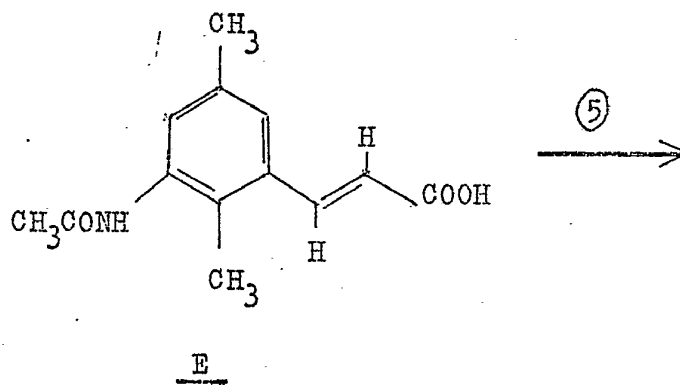
Hallado%: 66,78 6,51 6,11

30

02058

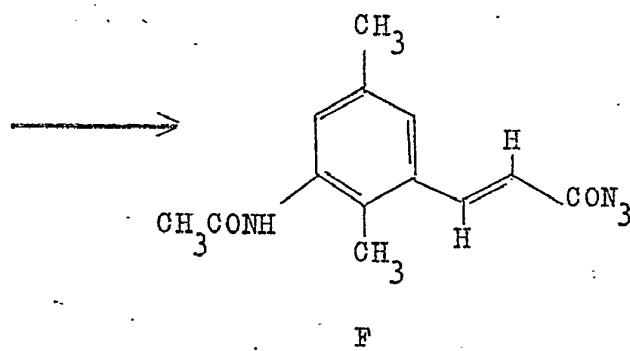
1

5



10

15



Dimetil-2,5-acetilamino-3-trans-cinamoilazida (F)

20

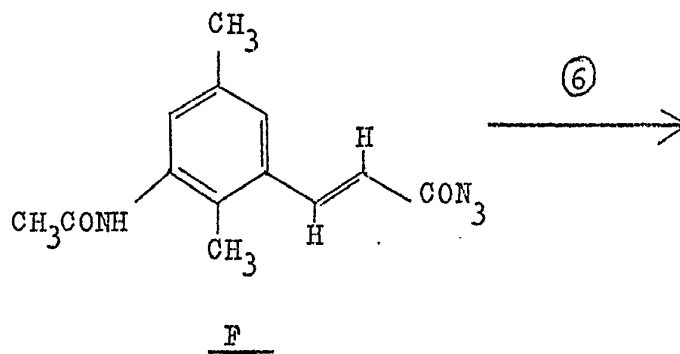
25

30

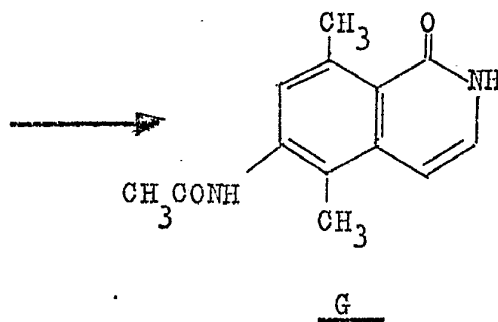
Se ha enfriado a 0°C la mezcla formada por 125 g del ácido cinámico E, 1,1 litros de acetona y 54 g de trietilamina, y luego se han añadido progresivamente, bajo agitación y manteniendo la temperatura a 0°C, 78,8 g de cloroformiato de etilo disueltos en 460 ml de acetona. Se ha dejado agitar durante una hora a 0°C, y mientras se continúa enfriando, para mantener la temperatura por debajo de 5°C, se ha añadido una solución de 52,5 g de nitruro sódico en el mínimo de agua. Tras el fin de la adición se ha agitado aún 1 hora a 0°C, se ha dejado volver a temperatura ambiente, y luego se ha vertido en 5 l de agua y filtrado con succión el precipitado formado. Este último ha sido

1 lavado abundantemente con agua, terminando con agua desti-
 lada, y luego con un poco de acetona, y por último se ha
 secado, obteniendo 107 g (77%) de finas agujas algodonosas
 que fundían a partir de 150°C, y que presentaban una sola
 5 mancha por cromatografía en capa delgada de gel de sílice.

Este compuesto F ha sido utilizado tal cual en
 la continuación de la síntesis.



15



Dihidro-1,2-oxo-1-dimetil-5,8-acetilamino-6-isoquinoleína (G)

25

A la mezcla constituida por 500 ml de éter dife-
 nílico y 28,6 g de tributilamina, calentada a 240°C y man-
 tenida bajo violenta agitación, se han añadido progresiva-
 mente, en 15 minutos, 39,6 g de la azida F en suspensión
 en 450 ml de éter difenílico, mantenido a 40°C, cuidando
 30 siempre que la temperatura no descienda por debajo de 235°C.

02058

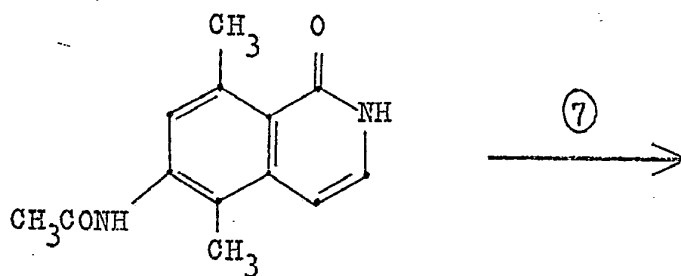
1 Tras el fin de la adición se ha dejado agitar durante otros
 15 minutos a 240°C, y luego se ha dejado enfriar, eliminan-
 do una parte del éter difenílico bajo vacío. Se ha observa-
 do la cristalización de un sólido, se han añadido 350 ml
 5 de benceno y se ha filtrado con succión el precipitado. Es-
 te ha sido recogido con 400 ml de etanol a ebullición, y
 la fracción insoluble, filtrada con succión, ha sido recri-
 talizada con 400 ml de dimetilformamida, filtrando en ca-
 liente, obteniéndose 18,7 g (53%) de pajillas incoloras co-
 rrespondientes al compuesto G.

Análisis: $C_{13}H_{14}N_2O_2 = 230,3$

Calculado %: C 67,80 ; H 6,13 ; N 12,17

Hallado %: 67,54 6,42 11,96

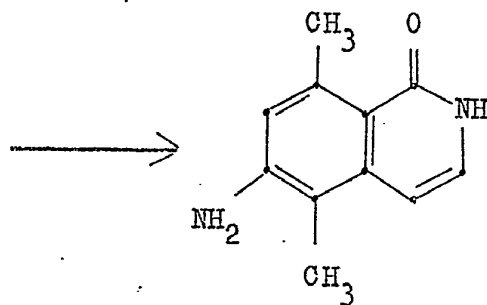
15



20

G

25

H

30

02058

1 Dihidro-1,2-oxo-1-dimetil-5,8-amino-6-isoquinoleína (H)

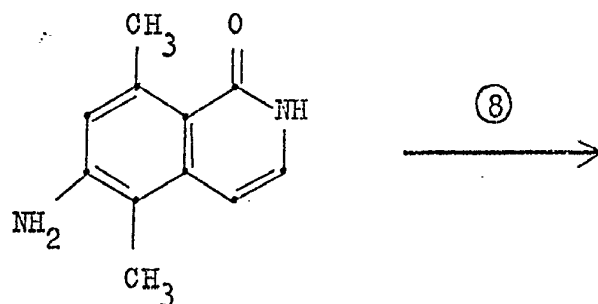
Se ha calentado a reflujo durante 2h 30 la mezcla formada por 10,6 g del compuesto G, 175 ml de etanol y 35 ml de ácido clorhídrico concentrado, se han añadido 5 300 ml de agua, se ha calentado de nuevo a ebullición y filtrado para eliminar una ligera fracción insoluble. Al filtrado enfriado se ha añadido una solución de sosa N, para llevar el pH a 9, y el precipitado formado ha sido filtrado con succión y luego recristalizado con etanol, dando 10 7,35 g (85%) de pajillas crema, correspondientes a la amina de fórmula H, punto de fusión 242°C.

Análisis: $C_{11}H_{12}N_2O = 188,2$

Calculado %: C 70,18 ; H 6,43 ; N 14,88

Hallado %: 70,25 6,15 14,52

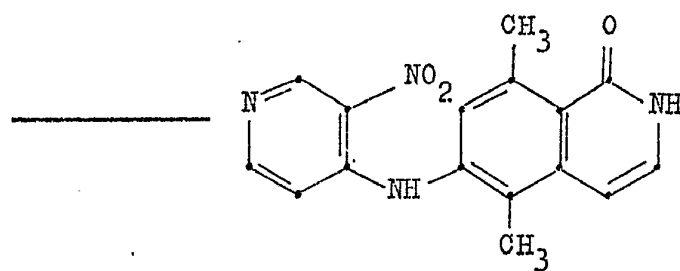
15



20

H

25

I

30

K 02058

1 Dihidro-1,2-oxo-1-dimetil-5,8-(nitro-3'-piridil)-4'-amino 7-6-isoquinoleína o dimetil-5,8-(nitro-3'-piridil)-4'-amino 7-6-isoquinoleína (I)

5 La mezcla formada por 34,7 g de la amina de fórmula H, 27,3 g de nitro-3-cloro-4-piridina y 1 l de dimetilformamida, ha sido agitada a temperatura ambiente durante 15 días, y se ha evaporado el disolvente. El residuo se ha recogido con 3 l de ácido clorhídrico N, y la fracción insoluble ha sido filtrada con succión. Correspondía esencialmente a un compuesto secundario indeseable, que se ha recristalizado con sulfóxido de dimetilo en microcristales rojo-naranjas, infusibles a 300°C.

10 Análisis: $C_{27}H_{23}N_5O_4 \cdot H_2O = 499,5$
 Calculado %: C 64,92; H 5,04; N 14,02
 15 Hallado %: 65,19 4,81 13,79

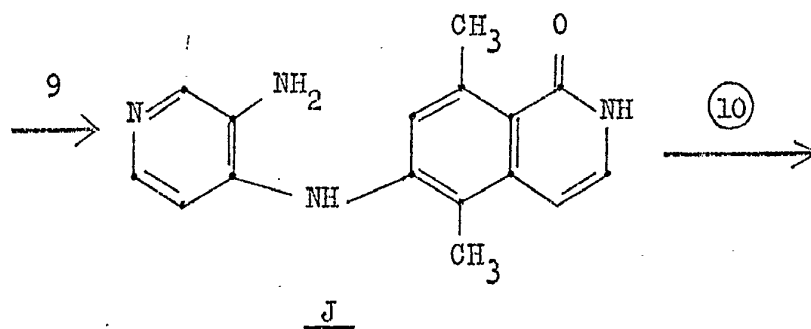
Se ha añadido a la fase acuosa una solución de sosa N, para llevar el pH a 9-10, y el precipitado formado ha sido filtrado y luego recristalizado con dimetilformamida, dando 22 g (39%) de microcristales amarillos, correspondientes al compuesto de fórmula I, punto de fusión 20 310-315°C.

Análisis: $C_{16}H_{14}N_4O_3 = 310,3$
 Calculado %: C 61,93; H 4,55; N 18,06
 25 Hallado %: 61,53 4,71 17,76

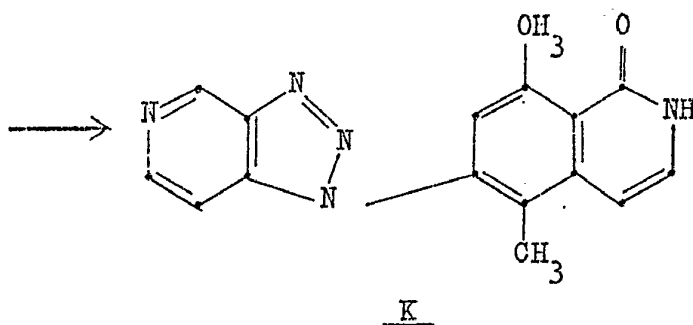
25

30

1



10



Dihidro-1,2-oxo-1-dimetil-5,8-(amino-3'-piridil)-4'-amino 7-6-isoquinoleína J y (dihidro-1',2'-oxo-1'-dimetil-5',8'-isoquinolil)-6')-1-triazolo (4,5c) piridina (K)

20

A 16,8 g del derivado nitrado I en 1 l de ácido acético se han añadido 17 g de níquel Raney e hidrógeno, agitando el conjunto en atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente y presión normal. La cantidad teórica de hidrógeno ha sido absorbida en aproximadamente 1 h, y se ha filtrado el catalizador y luego se han tomado 50 ml de la solución resultante.

25

30

Por evaporación de esta solución se ha obtenido un residuo, que se ha recogido con agua y alcalinizado por adición de una solución de sosa N. Habiendo filtrado con succión el precipitado formado, se ha recristalizado con acetonitrilo y luego con anisol, obteniendo microcristales

1 incoloros correspondientes a la amina de fórmula J, punto de fusión 212-215°C..

Análisis: $C_{16}H_{16}N_4O, H_2O = 298$.

Calculado %: C 64,41 ; H 6,08 ; N 18,78

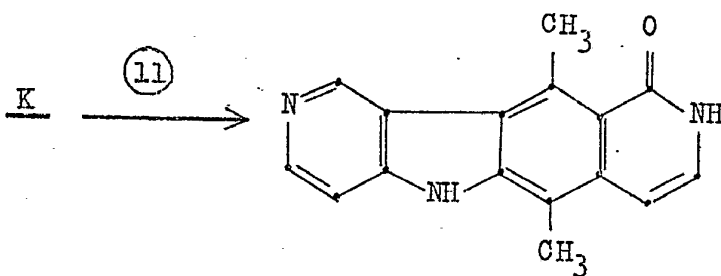
5 Hallado %: 64,14 5,83 18,83

El conjunto de la solución restante ha sido enfriado a 14°C y se ha añadido con agitación, en 15 minutos, una solución de 3,61 g de nitrito sódico en el mínimo de agua. Se ha continuado la agitación durante 1h30, dejando volver a temperatura ambiente, se ha eliminado el disolvente, recogido el residuo con agua, filtrado con succión y lavado el precipitado con agua. El sólido obtenido ha sido recogido con 1,5 l de etanol a ebullición, filtrado y luego concentrado a 600 ml, dando tras enfriamiento 12 g (o sea 80%) de microcristales crema correspondientes a la triazolopiridina de fórmula K; P. de F. = 300-302°C.

15 Análisis: $C_{16}H_{13}N_5O = 291$

Calculado %: C 65,97 ; H 4,5 ; N 24,04

Hallado %: 65,66 4,70 24,39



L

Dihidro-1,2-oxo-1-dimetil-5,11-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol L

30

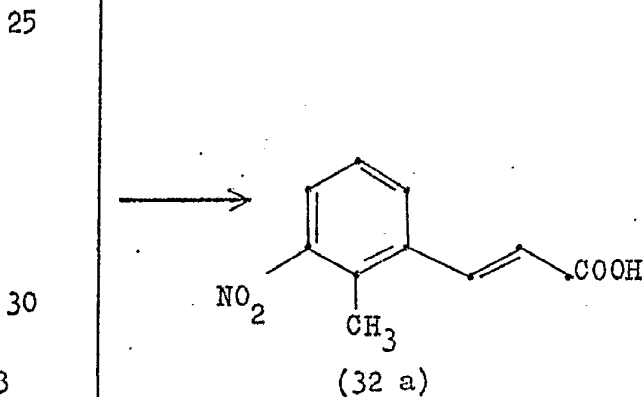
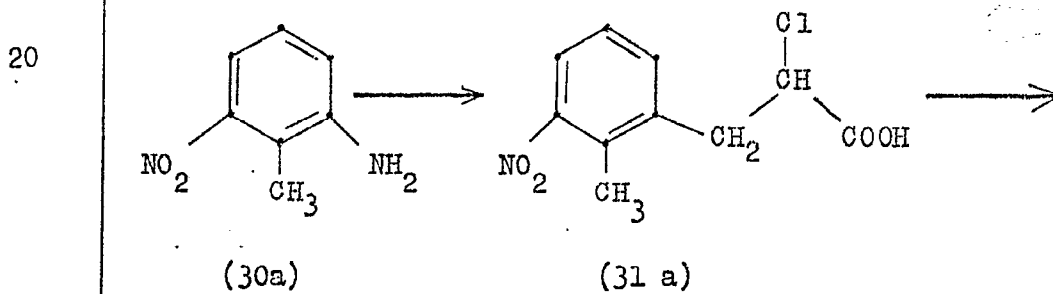
16 g de la triazolopiridina de fórmula K han si-

1 do mezclados con 80 g de fenantreno y, manteniendo todo ba-
 jo agitación, se ha calentado en baño metálico a 340°C du-
 rante 30 minutos, tiempo tras el cual ha cesado práctica-
 mente el desprendimiento de nitrógeno. Luego se ha calenta-
 5 do a 360°C durante 2 minutos, se ha dejado enfriar y se ha
 vertido en 500 ml de hexano. El precipitado insoluble ha
 sido filtrado con succión, lavado con hexano a ebullición,
 y luego recristalizado con dimetilformamida, dando 5,7 g
 (36,5%) de agujas grises, infusibles a 330°C.

10 Análisis: $C_{16}H_{13}N_3O \cdot \frac{1}{2} H_2O = 272,3$
 Calculado %: C 70,57 ; H 5,18 ; N 15,43
 Hallado %: 70,63 5,32 15,22

EJEMPLO 13

15 Este ejemplo ilustra el modo de operación b) pa-
 ra la obtención del compuesto de fórmula (12) en la que R'
 es hidrógeno, es decir, el compuesto de fórmula (12a) si-
 guiente:



1 Acido metil-2-nitro-3-cinámico trans (32a)

5 En un matraz de tres bocas, de 1 l, se han introducido 15,2 g de metil-2-nitro-3-anilina (30a) que se han disuelto en 200 ml de acetona, y se han añadido 17 ml de ácido clorhídrico concentrado, y luego se ha enfriado el conjunto a 0°C.

Manteniendo la solución por debajo de 5°C y bajo agitación, se ha diazotado añadiendo progresivamente una solución de 7,5 g de nitrito sódico en 25 ml de agua.

10 Tras haber dejado la solución precedente bajo agitación durante 30 minutos se ha vertido lentamente en un matraz de tres bocas que contiene una mezcla formada por 100 ml de ácido acrílico, 7,6 g de cloruro cúprico disueltos en 25 ml de agua y 100 ml de acetona, manteniendo la totalidad a una temperatura de 35°C durante toda la duración de la adición, que ha durado de 15 a 25 minutos.

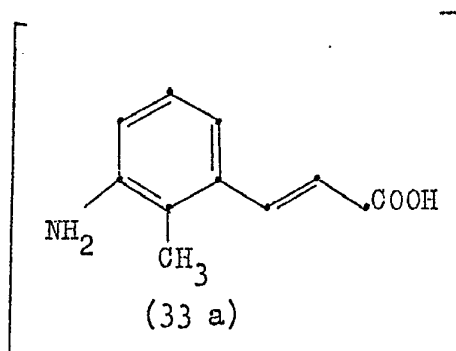
15 Esta nueva mezcla se ha mantenido bajo agitación a 35°C durante una hora, y luego se ha evaporado la acetona y el exceso de ácido acrílico. El residuo ha sido recogido con cloroformo, se ha lavado con agua, y la fase cloroformica ha sido agotada con una solución de sosa 2N fría (2 veces 50 ml). Por acidificación con ácido clorhídrico se ha precipitado el ácido (metil-2-nitro-3-fenil)-cloropropiónico (31a), que se ha filtrado con succión y secado.

20 Este último ha sido tratado enteramente calentándolo a reflujo durante 30 minutos en 100 ml de metanol que contienen 10 g de potasa, y tras evaporación se ha recogido el residuo en agua y se ha acidificado en frío con ácido clorhídrico. El precipitado ha sido filtrado, secado y recristalizado con xileno, dando el ácido metil-2-nitro-3-

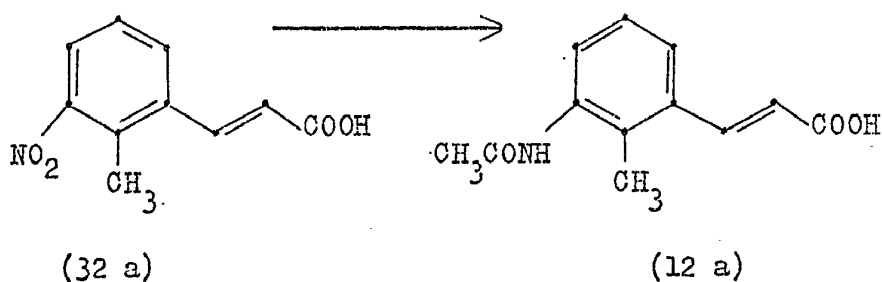
1 -cinámico (32c), punto de fusión 222°C.

Rendimiento (en relación a la amina utilizada): 11,9 g, o sea 57,5%.

5



10



15

Acido metil-2-acetilamino-3-trans-cinámico (12a)

En un matraz de tres bocas, de 2 l, se han disuelto 84,5 g de la nitroazida (32a) en 750 ml de ácido acético, se han añadido 100 g de níquel Raney comercial lavado con ácido acético, y luego hidrógeno, agitando en atmósfera de hidrógeno a presión normal y temperatura ambiente.

20

Se detiene la hidrogenación cuando el volumen de hidrógeno consumido ha sobrepasado el volumen teórico (28,4 l en vez de 27,4 necesarios), o sea tras 4 h 25 de agitación.

25

Se ha filtrado el catalizador con succión, se ha lavado con ácido acético y evaporado la mitad del disolvente. Luego se han añadido 90 ml de anhídrido acético y se ha calentado a reflujo durante 1 h 30, y luego se ha evaporado

30

02058

1 a sequedad.

El residuo ha sido recogido en 500 ml de ácido acético a ebullición, se ha filtrado en caliente para eliminar las sales de Ni insolubles, y por enfriamiento se han obtenido 44 g del ácido esperado.

5 Por concentración de las aguas madres se han recuperado aún aproximadamente 10 g del compuesto buscado (12a), punto de fusión 265-267°C. El rendimiento total era como mínimo 54 g, o sea 60,2%.

10 Ensayos farmacológicos

Los ensayos siguientes se han realizado, salvo indicación contraria, con lotes de 10 ratones.

Ensayo 1:

15 Estudio de las propiedades antitumorales de los compuestos obtenidos según el procedimiento de la invención, sobre la leucemia L 1210

Se han determinado las propiedades antitumorales de los compuestos obtenidos según el procedimiento de la invención, por su acción curativa sobre la leucemia experi-
20 mental L 1210 trasplantada.

Esta leucemia ha sido mantenida en ratones CBD 1 (C 57 B 16 x DBA/2). Fl. Los compuestos a ensayar han sido inyectados por vía intraperitoneal uno o varios días tras el trasplante de las células (una sola inyección).

25 Los resultados obtenidos, recogidos en la siguiente tabla I, se expresan como tanto por ciento de aumento del tiempo de supervivencia (ILS %), y como tanto por ciento del número de células destruidas por el compuesto a ensayar, siendo la supervivencia de los animales proporcional al número de células inyectadas.

1 El tanto por ciento de proporción de superviven-
cia, ILS % (Cancer.Res. 1971, 31, 1883-1887) es la rela-
ción:

5
$$ILS \% = \frac{S^t - S^c}{S^c} \times 100; S^t = \text{supervivencia de los ani-}$$

males tratados
$$S^c = \text{supervivencia de los ani-}$$

males de control

10 Los resultados de la tabla I muestran que los
productos según la invención poseen propiedades antitumo-
rales.

Ensayo 2:

Leucemia inducida por virus: leucemia de Friend

15 Se ha investigado el poder protector de los com-
puestos según la invención frente a la leucemia de Friend,
inoculada a ratones DBA2 de 5-6 semanas de edad. La inocu-
lación viral se ha realizado a partir de un homogeneizado
de rata leucémica (p/volumen) diluido a 1/250 en tampón fos-
fato isotónico sin Ca^{++} ni Mg^{++} (PBS), correspondiente a
20 100 SD 50 (es decir, a la dosis de virus que provoca esple-
nomegalia en el 50% de los ratones inoculados).

25 El virus ha sido inyectado por vía intraperito-
neal y con un volumen de 0,2 ml. El producto a ensayar ha
sido inyectado 5 horas después del virus, o 1 día después
del virus, en la dosis indicada en un volumen de 0,1 ml
(vía I.P.). Cada grupo de veinte ratones testigos ha reci-
bido el virus y un placebo o el producto a ensayar, se han
sacrificado 10 ratones el día 21º, y se ha retirado y pe-
sado el bazo. Los ratones se consideraban leucémicos cuan-
do el peso de su bazo excedía de 200 mg. Para los 10 rato-
nes se ha determinado la supervivencia de los animales.

30

02058

1 Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla
II. Estos resultados muestran que los productos obtenidos
según el procedimiento de la invención poseen actividad
antiviral, además de su actividad antitumoral.

5 Ensayo 3:

Estudio del desarrollo del sarcoma inducido por virus, de
Moloney

 La inyección de virus de Moloney (C. Jasmin y
otros, J.Nat. Cancer Inst. 1974 53, 469-474) por vía intra-
10 muscular, a ratones recién nacidos, ha conducido tras 10
días a la formación de un sarcoma. La aparición del tumor
era proporcional a la dosis de virus inyectada. La inocu-
lación viral ha estado constituida por triturado de tumor
diluído a 1/250, lo que corresponde a 10 TID 50, es decir,
15 a la dosis de virus que provoca la aparición de tumores en
el 50% de los animales infectados. A esa dosis el 80 a
100% de los animales han desarrollado tumor, y el 100% de
los supervivientes han quedado leucémicos. Por tanto, la
experiencia ha consistido en anotar el número de ratones
20 que presentan tumores, la regresión o no de esos tumores,
y, por último, en sacrificar los animales supervivientes
tras 2 meses y observar la presencia de esplenomegalia o
no (control de una leucemia). El virus se ha inoculado a
ratoncillos recién nacidos, de 3 a 5 días, por vía intra-
25 muscular, y los ratones han recibido al día siguiente
(D + 1), o 5 horas tras la inyección (D0 + 5 h), el produc-
to a ensayar, por vía intraperitoneal. Los resultados ob-
tenidos son los siguientes:

Virus testigos 80% de los ratoncillos han presentado
 tumores

1 10% de los tumores han experimentado regresión

30% de los animales han sobrevivido, y todos han presentado leucemia

5 Compuesto del ejemplo 7: inyección a D + 1; 1 μ g/ratoncillo (0,5 mg/kg)

70% de los ratoncillos han presentado tumores

90% de los tumores han experimentado regresión

10

90% de los animales han sobrevivido
0% de leucemia

HUM: inyección a D + 1; 5 μ g/ratoncillo (2,5 mg/kg)

20% de los animales presentan tumor
100% experimentan regresión

15

10% de los ratones son leucémicos

HUM: inyección a D + 1, 1 μ g/ratoncillo (0,5 mg/kg)

30% de los animales presentan tumor
90% experimentan regresión

20

90% supervivientes

33% son leucémicos

Virus testigos

90% de los animales presentan tumor

40% de los tumores han experimentado regresión

25

90% de los ratones han sobrevivido

45% de los ratones son leucémicos

Compuesto del ejemplo 7: inyección a D0 + 5 h; 1 μ g/ratoncillo (0,5 mg/kg)

30

5% de los animales presentan tumor

02058

- 1 100% han experimentado regresión
100% han sobrevivido
40% presentan leucemia

Compuesto del ejemplo 1: inyección a D0 + 5h; 1 μ g/raton-
cillo (0,5 mg/kg)

- 5 50% de los animales presentan tumor
30% experimentan regresión
75% sobreviven
65% son leucémicos

10 Ensayo 4:

Investigación de la toxicidad

Se ha buscado la dosis tóxica, para ratones adul-
tos (C 57, BL 6 x DBA/2)F1, y para ratones recién nacidos,
de los compuestos obtenidos según la invención por inyec-
ción por vía intraperitoneal.

- 15 Los resultados obtenidos se dan a continuación:

1 - Con ratones F1 adultos (C 57 BL 6 x DBA/2) F1 (vía in-
traperitoneal)

a) Compuesto del ejemplo 1:

20 Inyección de 3 mg/ratón (80 mg/kg) = 5 muertes / 6

1 mg/ratón (40 mg/kg) = 1 muerte / 8

0,5 mg/ratón (20 mg/kg) = 1 muerte / 6

b) Compuesto del ejemplo 7:

Inyección de 1 mg/ratón (50 mg/kg) = 1 muerte / 3

25 0,6 mg/ratón (30 mg/kg) = 5 muertes / 10

0,5 mg/ratón (25 mg/kg) = 0 muertes / 5

0,3 mg/ratón (15 mg/kg) = 0 muertes / 6

La DL₅₀ del compuesto del ejemplo 7 es por tanto 30 mg/kg.

2 - Con ratones recién nacidos (vía intraperitoneal)

5 μ g: 2,5 mg/kg = 3 muertes/8, aspecto enclenque
de los ratones

1 HUM 10 μ g: 5 mg/kg, aspecto enclenque de los
ratones

5 Estos resultados muestran que la dosis tóxica
del compuesto del ejemplo 7 es superior a 2,5 mg/kg de ra-
tón.

Ensayo 5:

Efecto citotóxico in vitro

10 Los efectos citotóxicos de los compuestos obte-
nidos según el procedimiento de la invención han sido en-
sayados en cultivos in vitro de células de hámster, hombre
y ratón.

15 En particular, se han utilizado la línea BHK21
de células de hámster, y un agregado derivado de esa lí-
nea, transformada por el virus de sarcoma del hámster (agre-
gado HS5).

20 Tras desprendimiento con tripsina, las células
se han puesto en cultivo en cajas Petri de plástico, de
35 mm de diámetro, a concentración de $2 \cdot 10^5$ células/caja,
en un medio de cultivo de "Eagle" con adición de caldo de
bactotriptofosfato "Difco" y 10% de suero de ternero (M.
STOKER e I. MACPHERSON, *Virology* 14, 1961, 359).

25 Tras 5 horas las células han sido unidas a un
soporte de plástico, y se han añadido los productos a en-
sayar, cuyas diluciones se han hecho con agua o DMSO (sul-
fóxido de dimetilo) si el producto es poco soluble en agua.
En este último caso se ha realizado un testigo con la mis-
ma concentración final de DMSO en el medio de cultivo.

El estado de las células se ha examinado 24, 48
y 72 horas después.

30 Los resultados (tabla III) muestran claramente

1 que los productos son netamente citotóxicos a concentraciones comprendidas entre 0,2 y 10 μ M, y que el producto más activo, es decir, el compuesto del ejemplo 7, es tan activo como los derivados ya conocidos, el acetato de metil-2-
5 -hidroxi-9-elipticinio y 9-hidroxielipticina.

Lós efectos sobre los dos tipos de células, normal y transformada, son similares.

Ensayo 6:

Acción sobre las síntesis macromoleculares

10 La acción de los compuestos obtenidos según el procedimiento de la invención ha sido estudiada por incorporación de precursores marcados por isótopos radiactivos:

timidina-metilo C^{14} para estudiar la síntesis de DNA

15 uridina $^3H^5$ para la de RNA

valina $^3H^v$ para la de proteínas

Estos precursores han sido dados durante una duración de 30 min, a tiempos variables tras la adición del producto a ensayar.

20 La incorporación se mide tras lisis de las células para 1% de dodecilsulfato sódico, y precipitación con 5% de ácido tricloroacético. El precipitado soluble en ácido se recoge con filtros de fibra de vidrio Whatman GP/A. Los filtros se secan y cuentan en un espectrómetro
25 de centelleo de líquido.

La tabla IV da los resultados típicos para el compuesto del ejemplo 1 dimetil-5,11-dipirido [4,3-b]-[3,4-f] indol.

Se comprueba que este compuesto disminuye muy rápidamente, desde las primeras horas de su adición, las

1 síntesis de DNA y RNA, y en menor grado la síntesis de pro-
teínas.

5 Las experiencias realizadas con células sincro-
nizadas (G. TORPIER, J. GRUBST y L. MONTAGNIER, Experimen-
tal Cell Research 85, 1974, 437) han mostrado que el com-
puesto del ejemplo 1 detiene, desde los primeros minutos de
su adición, la repetición del DNA, a la vez en sus fases
de iniciación y de alargamiento.

Ensayo 7:

10 Estudio in vitro de la actividad antitumoral

Esta actividad ha sido medida en una línea tumo-
ral derivada de la leucemia de ratones debida al virus de
C. Friend.

15 Las células tumorales se multiplican en suspen-
sión en un medio de "RPMI 1640" (Catálogo de GIBCO Bio-
-cult. Ltd., Washington Road, Sandyford Industrial Estate,
PAISLEY PA3 4EP, RENFREWSHIRE, Escocia), con adición de
20% de suero de ternero embrionario, penicilina y estrept-
tomicina. El tiempo de desdoblamiento de estas células es
20 de 11 horas. La "fracción de crecimiento" es igual a 1 o
muy próxima a 1 (todas las células están en el ciclo). Los
cultivos se vuelven a iniciar en tiempo $t = 0$ a concentra-
ción de $2 \cdot 10^5$ células por ml, en cajas "Falcon" que con-
tienen 4 ml de medio. Veinticuatro horas más tarde se ha
25 añadido el producto a ensayar, es decir, en un momento en
el que los cultivos están en fase exponencial de crecimen-
to. Veinticuatro horas tras la adición del producto se han
contado las células, y el tanto por ciento de células vi-
vas se ha determinado por un ensayo de exclusión con azul
"tripan". Por tanto, se pueden definir dos dosis:

30

02058

1

(1) una dosis letal al 50%, y

(2) una dosis letal al 100%.

5

	DL 100	DL 50	Actividad [≠] $\frac{DL\ 50\ HUM}{DL\ 50\ X}$
Producto de referencia: acetometilato-hidroxi- 9-elipticinio (HUM)	$7\ 10^{-7}$	$3\ 10^{-7}$	1
Compuesto del ejemplo 1	$5\ 10^{-7}$	10^{-7}	3
Compuesto del ejemplo 2	$5\ 10^{-6}$	$1,5\ 10^{-6}$	0,2
Compuesto del ejemplo 5	$6\ 10^{-6}$	$2\ 10^{-6}$	0,15
Compuesto del ejemplo 6	$5\ 10^{-6}$	10^{-6}	0,3
Compuesto del ejemplo 7	$5\ 10^{-8}$	10^{-8}	20

10

15

[≠] Actividad: esta cifra (proporción entre DL₅₀ de HUM y DL₅₀ del producto ensayado), absolutamente arbitraria, permite tener una idea de las actividades de los diferentes productos comparándolos con el HUM, producto más activo de la serie de las elipticinas

20

Ensayo 8:Toxicidad aguda en vivo

25

Los productos a ensayar han sido inyectados por vía intraperitoneal en grupos de 10 ratones, a diluciones variadas. Cada día se ha determinado el número de animales muertos. Si las dosis se eligen bien, se ha podido definir para cada producto una dosis letal al 100% y una dosis letal al 50%. Este estudio está limitado a dos meses. Se han utilizado sistemáticamente dos líneas isógenas de ratones: C3H/He e ICFW.

30

02058

1

	Línea de ratones	DL ₁₀₀	DL ₅₀
Compuesto del ejemplo 1	C3H ICFW	200 mg/kg > 200 mg/kg	100 mg/kg 150 mg/kg
Compuesto del ejemplo 7	C3H ICFW	35 mg/kg 25 mg/kg	20 mg/kg 15 mg/kg

5

Ensayo 9:Acción sobre células tumorales cloromonocitarias

10

En este ensayo se ha determinado la acción de los productos según la invención sobre células tumorales cloromonocitarias, según el ensayo de cloroleucemia del ratón (ratón ICFW, línea CFW cosanguínea) aislada en la Unidad 22 (B. TAMBOURIN y F. WENDLING) del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), en ratones inyectados con una variante del virus de Friend.

15

El tumor mata a todos los animales inyectados en 19,3 ± 2 días. Este tumor se desarrolla en forma ascítica semisólida; el peritoneo es invadido a la vez por masas tumorales sólidas y células en suspensión en el líquido ascítico. El tumor es transmitido por las células de la suspensión, que dan origen a las masas tumorales y a las células ascíticas.

20

25

	Tiempo medio de supervivencia sin tratamiento	Tiempo medio de supervivencia tras tratamiento
Compuesto de fórmula 8 (40 mg/kg 6 horas tras el trasplante)	18,5 ± 2 d	25,3 ± 3,1 d
Compuesto 21 (1 mg/kg 24 horas tras el trasplante)	18,9 ± 1,8 d	29,0 ± 3,0 d

30

1 Ensayo 10:

Comparación de la actividad antitumoral del compuesto según el ejemplo 7 y la de productos conocidos

5 Se ha inyectado a ratones leucémicos L 1210 el compuesto del ejemplo 7, es decir, (γ -dietilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol, o compuestos conocidos, 1 o 3 días tras el trasplante de las células, a las dosis indicadas en las tablas V a VII, y se ha medido la media del tiempo de supervivencia (MTS) y el tanto por ciento de aumento del tiempo de supervivencia (ILS %).

10

Se pueden hallar indicaciones relativas a los productos conocidos utilizados en este ejemplo, y sobre todo a sus propiedades antitumorales, sus efectos secundarios, así como su utilización en el hombre, en "La Chimiothérapie des Cancers" (Quimioterapia del cáncer), de G. MATHE e Y. KENIS, Expansion Scientifique Française, 3ª edición, París 1975.

15

Ensayo 11:

20 Se ha inyectado a ratones leucémicos L 1210 el compuesto del ejemplo 8 (compuesto 22), es decir, (γ -dimetilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol, un día después de los trasplantes de las células (día D + 1), a las dosis indicadas en la tabla VIII, y se ha medido la media del tiempo de supervivencia (MTS y el aumento del tiempo de supervivencia (ILS %).

25

Este ensayo se ha realizado con 10^3 , 10^4 y 10^5 células leucémicas en el día D. Se ha realizado igualmente este ensayo con el compuesto del ejemplo 7, es decir,

30 (γ -dietilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b]

1 [3,4-f] indol (compuesto 21).

Los resultados obtenidos se indican en la tabla VIII. Se ha indicado igualmente en esa tabla el número de ratones supervivientes; se considera superviviente a un ratón si ha sobrevivido al menos 2 a 3 meses después de la inoculación de las células leucémicas.

5 Ensayo 12:

Estudio de la protección de ratones leucémicos (células trasplantadas L 1210) por una dosis única o una dosis fraccionada

10 Se ha inyectado a ratones leucémicos L 1210 el compuesto del ejemplo 7, es decir, (γ -dietilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol, en una sola inyección (10 mg/kg en el día D + 3), o por dosis fraccionadas (2,5 mg/kg cada inyección, en los días D + 3, D + 4, D + 5 y D + 6).

Los resultados consignados en la tabla IX muestran que una dosis única posee una actividad antitumoral más elevada que la misma dosis inyectada en 4 veces.

20 Ensayo 13:

Carcinoma de Lewis

Para este ensayo se puede hacer referencia a las siguientes obras:

25 - Carcinoma pulmonar de Lewis (3LL), SUGIURA K. y STOCK C.C., Cancer Res., 1955 15 38-51.

- La quimioterapia del cáncer, de G. MATHE e Y. KENIS, Expansion Scientifique Française, 3ª edición, París 1975.

30 - SCHEPARTZ S.A., Screening, 1971, Cancer Chemother.Rep. parte 3, vol. 2, pág. 3.

1 Según este ensayo se inyectan por vía intramuscular, a ratones (BDF_1), unas células (10^6 células) tomadas de un ratón portador de tumor. Los ratones desarrollan, 10 a 15 días después de la inoculación, un tumor en el lugar de la inyección. Por otra parte, estas células experimentan metástasis al pulmón, formando colonias en la superficie pulmonar. Por tanto, con ratones así tratados se puede juzgar el efecto antitumoral y antimetastásico de un producto.

5
10 Busqueda del efecto antimetastásico de los compuestos de los ejemplos 7 y 8 de la invención.

15 10^6 células tomadas de un ratón portador de tumor han sido inyectadas por vía intramuscular (pata izquierda) a lotes de 10 ratones, y los compuestos a ensayar han sido inoculados por vía intraperitoneal en el día D+5, por inyección única o fraccionada. Se ha determinado la media del tiempo de supervivencia (MTS) y el aumento del tiempo de supervivencia (ILS %).

20		nº de inyecciones	MTS	ILS %
	Controles no tratados		25	
	Ratones tratados con el compuesto del ejemplo 7	4 inyecciones D+5+6+10+11 2,5 mg/kg cada una	27,4	9,6
25	"	1 inyección D+5 10 mg/kg	32,7	30,8
	Ratones tratados con el compuesto del ejemplo 8	D+5 5 mg/kg	27,44	9,8

1 Se puede concluir que hay acción protectora de
los compuestos de los ejemplos 7 y 8, en lo que se refie-
re a la invasión pulmonar metastásica del pulmón. En efec-
to, se han sacrificado en el día D+22 un ratón tratado y
5 un ratón no tratado, y se han contado las metástasis pul-
monares; se han contado 77 metástasis en el ratón no tra-
tado, y 35 en el ratón tratado en el día D+5 (una sola in-
yección) con el compuesto según el ejemplo 7.

TABLA I

Estudio de las propiedades antitumorales de los compuestos según la invención sobre la leucemia L1210

Compuesto ensayado	Experiencia	Número de células inyectadas	Cantidad en mg/ratón (mg/kg)	IIS %	Número de células que se vuelven a hallar	Número de células muertas	Ratones supervivientes
Compuesto del ejemplo 1 (fórmula 8)	Experiencia nº 1 D+2**	10 ⁶	1 mg/ratón (50 mg/kg)	34,32	10 ⁵	90%	0
		10 ⁵		15,73	40.000	60%	0
		10 ⁴		14,78	6000	40%	
"	experiencia nº 2 D+1**	10 ⁶	1 mg/ratón (50 mg/kg)	47,3	8000	99%	
		10 ⁵		38,1	2000	98%	
		10 ⁴		11,8	5000	50%	1/10
Compuesto del ejemplo 1 (fórmula 8)	experiencia nº 3	0,1 mg/ratón 0,05 mg/ratón		sin diferencia significativa con los controles 10 ⁴ células			
		10 ³ células					
Compuesto 20 (ejemplo 6)		0,1 mg/ratón		0,1 mg tóxico y sin diferencia con los controles 10 ⁴ células			
		10 ³ células					

TABLA I (continuación)

Estudio de las propiedades antitumorales de los compuestos según la invención sobre la leucemia L 1210

Compuesto en- sayado	Experiencia	Número de células inyectadas	Cantidad en mg/ratón (mg/kg)	IIS %	Número de cé- lulas que se vuelven a hallar	Número de células muertas	Ratones su- pervivientes
Compuesto 21 (ejemplo 7)	producto inyectado I.P. D+1**	10 ⁴	0,1 mg/ratón (0,5 mg/kg)	33,3	60	99,94	1/10
			0,1 mg/ratón (5 mg/kg)	11,5	10 ³	90	
		10 ³	0,01 mg/ratón (0,5 mg/kg)	17,4	80	92	
			0,1 mg/ratón (5 mg/kg)	23,2	40	96	5/10
HUM ^{***}	producto inyectado I.P. D+1***	10 ⁴	0,1 mg/ratón (5 mg/kg)	22,6	400	96	1/10
			0,1 mg (5 mg/kg)	22,15	60	94	3/10
		10 ³	0,1 mg/ratón (5 mg/kg)				
			0,1 mg (5 mg/kg)				

* HUM: acetato de 2-N-metil-9-hidroxi-elipticinio

** D+1 o D+2: inyección uno o dos días tras el trasplante de las células

TABLA II

Leucemia inducida por virus: leucemia de Friend

Ratón	Virus	Producto a ensayar	Media del tiempo de supervivencia ^{***} , días	**** IIS %	Peso de las ratas el día 21 ^o , mg
Control	* VFA 1/250 (1) VFA 1/250 (2)	- -	31,7 (26-47) 28 (14-47)		2519 mg (2866-1919)
Tratado	VFA 1/250	compuesto del ejemplo 1 (fórmula 8) 5 h tras el virus 0,1 0,5 1 mg	47,6 (26-78) 34,2 (22-54) 41,7 (14-81)	59,5 14,6 39,7	2013 mg (887 - 2793) (1803 mg) (718-2635) 959,6 mg (373-1230)

Ratones DBA2 macho, de 5-6 semanas de edad

Experiencia del 4.8.76: * VFA: virus de Friend con anemia, inyectado por vía I.P., 0,2 ml de dilución 1/250 ~ 100 SD 50

*** Media del tiempo de supervivencia, entre paréntesis, fechas en las que han muerto el primero y el último de los ratones

**** Aumento del tiempo de supervivencia por 100.

TABLA III

Dosis mínima que implica una inhibición completa del crecimiento (†)

Células	Compuesto ejemplo 1	Compuesto ejemplo 2	Compuesto ejemplo 5	Compuesto ejemplo 6	Compuesto ejemplo 7	HE*
CL3/8	0,5 / μ M	2	5	2	0,25	0,25
HS 5	0,5 / μ M	2	5	2	0,25	0,25

* HE = 9-OH-hidroxi-elipticina o acetometilato-2-hidroxi-9-elipticinio

TABLA IV

Inhibición de síntesis macromoleculares por el compuesto del ejemplo 1

Tiempo en horas del marcado tras la adición del producto	Incorporación en el DNA (en % del control no tratado)	Incorporación en el RNA (% del control no tratado)	Incorporación en proteínas (% de células no tratadas)
0,5	41	33	40
3	14	13	37
6	6,3	3,7	16
9	6	9	17
24	4	31	17

- la concentración del producto es de 5 μ M.

- las células HS5 se han puesto en cultivo 24 horas antes, a concentración de $5 \cdot 10^5$ por caja Petri de 60 mm.

TABLA V

Compuesto ensayado	Inyección	Cantidad por ratón	Intervalo de muerte	MDS	IIS %
Control 10 ⁴ células	D+1	0,2 mg	10 - 15 j	11	
Compuesto del ejemplo 7	D+3	0,2 mg	6 - 1 ratón vivo el día 30º	13,8	25,45
Compuesto del ejemplo 7	D+3	0,1 mg	11 - 17	11	0
Thiotepa	D+3	0,016 mg	10 - 11	11,54	4,95
Mitomycine	D+3	0,1 mg	10 - 15	11,1	0,9
BCNU	D+3	0,250 mg	10 - 12	15,9	44,62
Methotrexate	D+3	4 mg	15 - 17		
Endoxan	D+3		13 - 3 ratones vivos el día 30º		10

TABLA VI

	Cantidad en mg/ratón	Inyección	Intervalo de muerte	MTS	IIS %
Control 10 ⁵ células			9 - 10	9,06	
Thiotepa	0,1 mg	D+3	9 - 10	9,2	1,54
Mitomycine C	0,016 mg	D+3	9 - 10	9,06	0
BCNU	0,1 mg	D+3	8 - 9	8,8	0
Methotrexate	0,250 mg	D+3	12 - 14	12,62	39,35
Compuesto del ejemplo 7	0,2 mg	D+1	9 - 16	12,6	39,07
		D+3	10 - 15	12,27	35,43
Endoxan	4 mg	D+3	15 - 21	18,6	105,30

TABLA VII

Compuesto ensayado	Inyección	Cantidad	Intervalo de muerte	MIS	IIS %
Control 10^5 células			10 - 11		
Compuesto del ejemplo 7	D+3	0,2 mg/ratón	13- 16	14,18	36,35
ON GOVIN	"	0,5 μ g/ratón	10 - 13	10,8	3,85

TABLA VIII

Número de células L 1210 inyectadas el día D	Testigos	Compuesto utilizado	Cantidad inyectada en mg/ratón	MMS	ILS %	Número de ratones supervivientes
10 ³	-	-	-	13	-	-
	Ejemplo 8	0,1 mg/ratón	16,4	50,5	3	
	Ejemplo 8	0,05 mg/ratón	14,7	34,9	1	
	Ejemplo 7	0,2 mg/ratón	16,3	25,4	7	
10 ⁴	Ejemplo 7	0,2 mg/ratón	15	15,4	4	
	-	-	10,9	-	-	
	Ejemplo 7	0,1 mg/ratón	18	65,1	1	
	Ejemplo 8	0,1 mg/ratón	13,7	25,7	3	
10 ⁵	Ejemplo 8	0,05 mg/ratón	14,7	34,9	1	
	-	-	9,05	-	-	
	Ejemplo 8	0,1 mg/ratón	13,8	52,5	-	
	Ejemplo 8	0,05 mg/ratón	11,6	28,1	-	

Dosis en mg/ratón x 50 = dosis en mg/kg

TABLA IX

Número de células L 1210 inyectadas el día D	Testigos	Cantidad del compuesto del ejemplo 7 utilizada, en mg/ratón	Inyección	MIS	IIS%	Ratones supervivientes
10 ⁴	Testigos	0,2 mg/ratón 4 x (0,05 mg/ratón)	única el D+3 fraccionada D+3+4+5+6	11,9 14,2 14,4	19,32 21	1 0
10 ⁵	Testigos	0,2 mg/ratón 4 x (0,05 mg/ratón)	única el D+3 fraccionada D+3+4+5+6	10,4 14,18 13,4	36,35 28,85	

1 Ensayo 14:Leucemia inducida por virus: leucemia de Friend

5 A - Como en el anterior ensayo 2, el inóculo de virus de leucemia de Friend se obtuvo de bazo leucémico, y se diluyó para que contuviese 100 SD₅₀/0,2 ml (SD₅₀ = dosis aumentadora del bazo 50 por ciento). El producto a ensayar era el compuesto 21 (obtenido según el ejemplo 7). Se administró por vía I.P. como inyección única, 1 día después de la inoculación del virus.

10 Los resultados obtenidos se indican en la Tabla Xa. El tratamiento con este compuesto 21, así como con el compuesto del ejemplo 1 (véase Tabla II), tuvo como resultado un significativo aumento del periodo de vida.

15 La mitad de los ratones tratados con el compuesto del ejemplo 1 según el ensayo 2, o con el compuesto 21 según se ha explicado antes, se sacrificó 21 días después de la inoculación del virus, y su bazo se retiró y pesó. El peso medio del bazo para los ratones de control era 2.520 mg (1.919-2.866), y el de los ratones tratados con 20 5 mg/kg de compuesto del ejemplo 1 era 2.013 mg (887-2.793), con 25 mg/kg 1.803 (718-2.635), y con 50 mg/kg 960 (373-1.230). Para ratones inoculados con el compuesto 21 1 día después que el virus, el peso medio del bazo era 1.935 mg (500-2.950). La disminución de la esplenomegalia está en 25 línea con el aumento del periodo de vida, y sugiere que el compuesto también actúa como agente antiviral en este sistema.

1

TABLA XaAcción del compuesto 21 sobre la leucemia de Friend

5

	Droga (mg/kg)	Intervalo de muerte (en días)	MDS	ILS %
Ratones de control	0	20 - 56	32	
Ratones tratados con compuesto 21 (ej. 7)	5	27 - 52	44,5	39

10

B- Se ha trabajado según el modo de operación descrito en el anterior ensayo 2, utilizando como compuesto de la invención el compuesto 21, es decir, (γ -diethylaminopropyl)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol, obtenido según el ejemplo 7.

15

Este ensayo se ha realizado con una dosis única del compuesto 21 (20 mg/kg), y con diferentes dosis de virus.

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla Xb.

20

25

30

02058

1

TABLA Xb

Leucemia inducida por virus: leucemia de Friend

- Compuesto 21 dosis única: 20 mg/kg

- diferentes dosis de virus

5

10

15

20

	Intervalo (1) de muerte	MST (2)	ILS % (3)	Supervi- vientes 4 meses tras la inocula- ción
Virus testigos 1/500 (1000 SD ₅₀)	24-38	29,1	-	0
Compuesto 21 D+1	31-51	40,7	40	0
Virus testigos 1/2000 (250 SD ₅₀)	25-44	33,8	-	0
Compuesto 21 D+1	50-82	55,4	64	2
(Virus testigos 1/1000)	18-36	24,3	-	0
Compuesto 21 D+1	30-54	44,4	82,7	0

(1) Intervalo de muerte: la primera cifra indica la fecha del primer ratón muerto, la segunda fecha del último ratón muerto.

(2) MST: Media del tiempo de supervivencia

(3) ILS % (increased life span) = aumento del tiempo de supervivencia, solo tiene en cuenta los animales muertos.

25

$$\frac{MST_t - MST_c}{MST_c} \times 100$$

MST_t = animales tratados; MST_c = animales testigos

30

1 Ensayo 15:Leucemia L 1210

5 Se ha trabajado según el modo de operación del anterior ensayo 1, con el compuesto nº 8, es decir, dime-
til-5,11-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol, obtenido según el ejemplo 1. En este ensayo el compuesto 8 ha sido inyec-
tado 4 días tras el trasplante de las células, en dosis de 50 mg/kg. Los resultados se indican en la tabla XI, en la que se han presentado igualmente los resultados obteni-
10 dos con el mismo compuesto inyectado un día tras el trasplante de las células (véase experiencia nº 2 en la Tabla I). Los resultados muestran que el tanto por ciento de proporción de supervivencia (ILS %) es superior cuando el pro-
ducto se administra más pronto tras el trasplante de las
15 células.

02058

TABLA XI

Número de células	Droga	Dosis (mg/kg)	Día de inoculación	Intervalo de muerte	MST (día)	IIS %
10 ⁶	0	0	0	7 - 12	7,8	
10 ⁶	Compuesto del ej. 1	50	+1	9 - 15	11,5	47,3
10 ⁵	0	0	0	8 - 11	9,3	
10 ⁵	Compuesto del ej. 1	50	+1	10 - 13	12,85	38,1
10 ⁴	0	0	0	10 - 13	11	
10 ⁴	Compuesto del ej. 1	50	+1	11 - 14	12,3	11,8
10 ⁶	0	0	0	6 - 7	6,7	
10 ⁶	Compuesto del ej. 1	50	+4	8 - 13	9	34,3
10 ⁵	0	0	0	8 - 12	8,9	
10 ⁵	Compuesto del ej. 1	50	+4	10 - 11	10,3	15,7
10 ⁴	0	0	0	10 - 11	10,5	
10 ⁴	Compuesto del ej. 1	50	+4	10 - 16	12	14,7

* La droga se administra 1 día (+1) o 4 días después del inóculo de células Compuesto del ej. 1 = dimetil-5,11-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol

1 Ensayo 16:Relación entre estructura y actividad de diversos dipirido-indoles que difieren en la sustitución R'₁

5 La sustitución R'₁ en la posición 1 parece ser muy importante para el efecto protector de los derivados contra el crecimiento de las células de tumor L 1210.

10 La leucemia L 1210 se ha mantenido por pasos semanales en ratones (C57B16xDBA/2)F1. En el día 0 se inocularon los ratones, por vía I.P., con diversos números de células de tumor ascítico L 1210, en volúmenes de 0,1 ml. Subsiguientemente, según se indica, se administraron drogas en soluciones PBS exentas de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (Gibco) o en medio de MacCoy (Gibco o Microbiological Associates).

15 La relación entre el tamaño del inóculo de células leucémicas administrado I.P. y el período de vida del hospedador se determinó en grupos de 10 ratones tras inoculación de 10³ a 10⁶ células en 0,1 ml de medio de MacCoy. La disminución de la media de período de vida del hospedador, entre cada aumento consecutivo por diez en el tamaño del inóculo de células leucémicas era 2 días. Según 20 el método de cálculo de Dombernowsky, el tiempo de duplicación era 0,615 días.

25 Si la cadena lateral sustituyente R₁ es γ -dietilaminopropilo (compuesto 21) o γ -dimetilaminopropilo (compuesto 22), estos compuestos tienen una actividad antitumoral similar o mayor. Como se muestra en la Tabla XII, el compuesto 21 y compuesto 22 compiten favorablemente con el acetato de elipticinio (HUM), lo que indica que la estructura de pirido-indol es más eficaz que el núcleo de pirido-30 -carbazol (elipticina).

TABLA XIII

Número de células	Droga	Dosis mg/kg)	Día de inoculación	Intervalo de muerte	MST	ILS %	Superviv. a los 60 días
10 ⁴	0	0	0	10 - 14	11,8	-	0
10 ⁴	Compuesto 21	5	+1	13 - 21	16,2	33,3	1
10 ⁴	compuesto 21	0,5	+1	11 - 15	13,54	11,5	0
10 ⁴	HUM	5	+1	14 - 20	14,9	22,6	1
10 ³	0	0	0	13 - 16	13,8	-	0
10 ³	compuesto 21	5	+1	15 - 22	17	23,2	5
10 ³	compuesto 21	0,5	+1	14 - 20	16,2	17,4	3
10 ³	HUM	5	+1	14 - 20	16,86	22,15	3
10 ⁴	0	0	0	10 - 12	10,9		0
10 ⁴	compuesto 21	5	+1	14 - 21	18	65,1	1
10 ⁴	compuesto 22	5	+1	12 - 15	13,7	25,7	3
10 ⁴	compuesto 22	2,5	+1	10 - 19	14,7	34,9	1
10 ⁵	0	0	0	8 - 14	9,05		
10 ⁵	compuesto 22	5	+1	11 - 16	13,8	52,5	0
10 ⁴	0	0	0	10 - 13	11,2		
10 ⁴	compuesto del ejemplo 2	20	+4	10 - 17	11,3	0,9	0

1 Ensayo 17:Relación entre la longitud de la cadena sustituyente y la actividad

5 Se ha demostrado antes la importancia de la sustitución R'₁ en posición 1, para la actividad antitumoral de estos compuestos. Si se varía la longitud de la cadena lateral, γ -dietilaminopropilamino 1 para el compuesto 21, o γ -dimetilaminoetilamino 1 para el compuesto 23, como se muestra en la tabla XIII, ambos compuestos son activos contra la leucemia L 1210 a la misma dosis. Sin embargo, el

10 compuesto 21 es menos tóxico (50 mg/kg para el compuesto 21 y 25 mg/kg para el compuesto 23), tiene un ILS % mayor que el compuesto 23, y 1 ratón sobrevivió hasta 60 días. Estos resultados indican que la sustitución dietilaminopropilamino-1

15 corresponde a la mejor longitud de cadena para la acción terapéutica del derivado. Aumentando la cadena lateral en (α -metil- δ -dietilamino-butil)-amino 1, tal como en el compuesto 24, se halla un efecto antitumoral similar, confirmando que el compuesto 21 es el compuesto más activo

20 en ratones.

25

30

02058

1

TABLA XIII

	Día de inocula- ción	Intervalo de muer- te	MST	ILS	Supervi- vientes hasta 60 días
Control		8 - 9	8,8		
5 Compuesto 21	+ 1	12 - 18	14,9	69,2	1
Compuesto 23	+ 1	11 - 18	14,6	65,2	0
Control		10 - 13	11,2		
10 Compuesto 21	+ 4	14 - 32	18,5	65,6	0
Compuesto 24	+ 4	12 - 20	17,5	56,25	0

Ensayo 18:Relación entre dosis y actividad antitumoral L 1210 del com-
puesto 21

15

La respuesta a la dosis de la actividad del com-
puesto 21, como se muestra con leucemia L 1210, según el en-
sayo 1, es como sigue:

20

A 5 mg/kg, el tiempo medio de supervivencia (MST)
aumenta significativamente (ILS = 87 por ciento); a mayores
dosis de compuesto 21, el MST siempre aumenta significati-
vamente (ILS = 52 por ciento a 10 mg y 75 por ciento a 20
mg/kg), y algunos sobrevivieron hasta 60 días (10 por cien-
to de los ratones inoculados a 10 mg y 20 por ciento a 20
mg por kg).

25

Ensayo 19:Efecto del tiempo de administración del compuesto 21

Como se muestra en la Tabla XIV, una sola inyec-
ción de compuesto 21 aumentó significativamente el tiempo
medio de supervivencia, cuando se da tan tarde como 6 días
después de la inoculación con células L 1210. Los resultados

30

1 confirman que el compuesto 21 es más eficaz cuando se da
 más temprano tras la inoculación con células (ILS 56,4%
 al día +2, 43% al día +3, en vez de 20,8% al día +6 o 2%
 al día +7). El efecto de no protección en el día +7 se po-
 5 dría explicar por el hecho de que algunas células migran
 por un compartimento inaccesible para la droga (como se
 postula por J.B. Le Pecq para la 9-hidroxi-elipticina).

TABLA XIV

	Día de ad- ministra- ción ^{***}	Intervalo de muer- te	MST	ILS %	Número estimado de célu- las ^{***}	
10	Control	10 - 11	10,1			
	BD 40 ^{**}	+ 2	15 - 17	15,8	56,4	10 ⁵
		+ 3	12 - 17	14,4	43,0	5,10 ⁵
		+ 4	10 - 14	12,4	22,8	10 ⁶
15		+ 5	10 - 13	11,9	17,8	5,10 ⁶
		+ 6	10 - 14	12,2	20,8	10 ⁷
		+ 7	10 - 13	10,3	2,0	5,10 ⁷

* BD 40 se da I.P. a 0,1 ml que contienen 0,4 mg/ratón
 (20 mg/kg)

20 ** El día 0 es el día de inoculación de 10⁴ células L 1210,
 dadas I.P.

*** Evaluación del número de células leucémicas por medio
 del cálculo del tiempo de duplicación (según P. Dom-
 bernowsky).

Ensayo 20:

25 Estudio de la combinación del compuesto 21 con otras drogas

Un aumento de la protección de ratones inoculados
 con carcinoma pulmonar de Lewis 14 días antes de una dosis
 baja de cebado, seguida por una dosis alta de exposición,
 de endoxano fue descrito por J. Millar "Tenth congress of
 30 chemotherapy 1978", en prensa. G.A. Preasant "Cancer, vol.

1 40, 1977 pág. 987-993" (1977), para la terapia de carcinoma de mama resistente a las drogas, usó una combinación de endoxano, ECNU y Adriamicina al día siguiente.

5 Los resultados relativos a experimentos similares (carcinoma de Lewis y carcinoma de mamas resistente a las drogas) con el compuesto 21 se discuten en la Tabla XV. Se dió una dosis de cebado de endoxano (100 mg/kg) 3 días después de 10^5 células leucémicas (20 ratones). Al día siguiente 10 ratones recibieron 0,1 ml de PBS (ratones testigos), y 10 ratones recibieron 20 mg/kg de compuesto 21. El aumento del periodo de vida fue significativamente mayor en los ratones que recibieron endoxano y compuesto 21, en comparación con los ratones con endoxano o compuesto 21 solo. Los resultados relacionados en la Tabla XV sugieren que 15 el compuesto 21 dado un día después que el endoxano o endoxano-ECNU originó una protección mayor de los ratones que el endoxano, endoxano + ECNU o compuesto 21, dados solos. Tomando como ratones testigos los ratones tratados con endoxano, el ILS % es 57 para ratones tratados con endoxano + compuesto 21, y 63 para ratones tratados con endoxano + ECNU + compuesto 21. 20

25

30

02058

1

TABLA XV

	<u>Intervalo de muerte</u>	<u>MST</u>	<u>ILS %</u>	
	Control	10 - 13	11,2	-
	Endoxano	11 - 17	13,1	16,9
5	BD 40	14 - 32	18,5	65,2
	Endoxano + BD 40	18 - 24	20,6	84
10	Endoxano + BCNU	10 - 17	13,7	22,3
	Endoxano + BCNU + BD 40	18 - 24	21,4	91

15

El BD 40 se da I.P. el día + 4 (20 mg/kg)

El endoxano se inocula I.P. el día +3 (100 mg/kg), y el BCNU inmediatamente después que el endoxano (2 mg/kg)

20

El día 0 es el día de inoculación de 10^5 células, dadas I.P.

Ensayo 21:Toxicidad de los compuestos 21, 22, 23 y 24

25

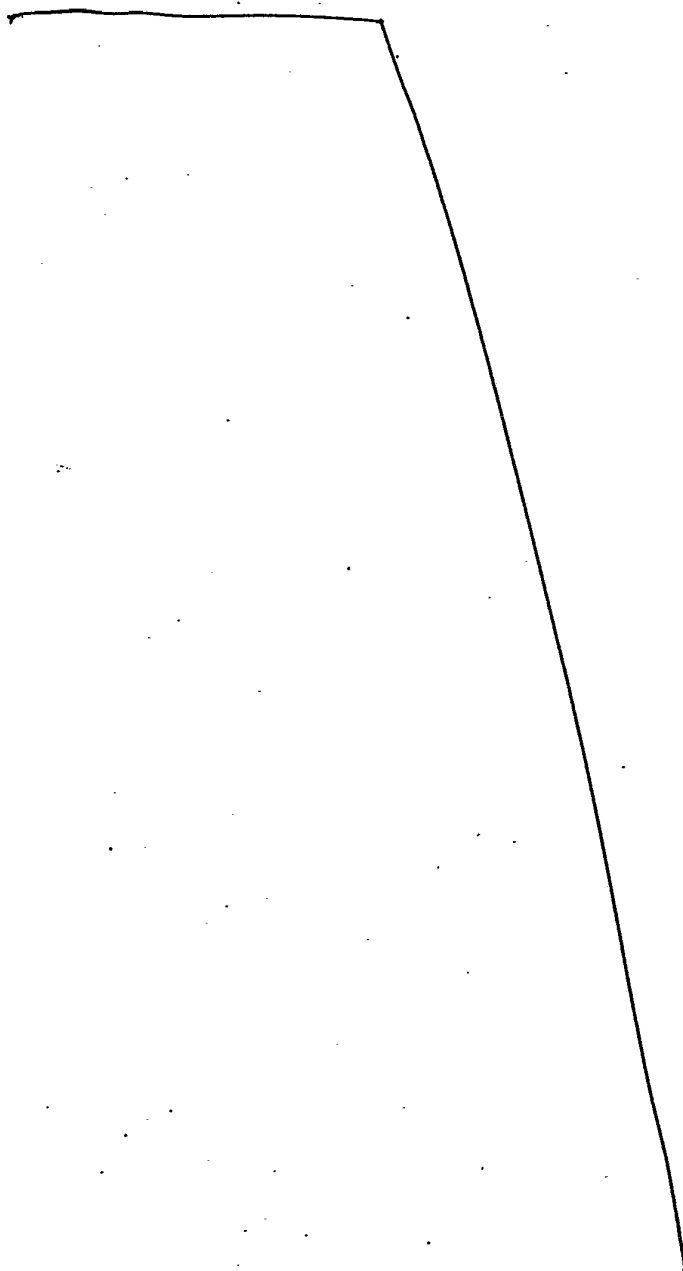
Todas las drogas se disolvieron en soluciones acuosas ajustadas a pH 5 con ácido acético, y se inocularon en los ratones a un volumen de 0,1 ml, I.P., tras dilución en medio de MacCoy.

30

02058

La toxicidad de las drogas tras inyección intraperitoneal se estimó a partir del régimen de mortalidad hasta el día 30°. La cantidad mínima que dió como resultado 100% de muertes fue 50 mg/kg para el compuesto 24, 50

1 mg/kg para el compuesto 21 y para el compuesto 22, 25 mg/
kg para el compuesto 23. En general, las muertes tuvieron
lugar pronto tras la administración de la droga (4-6 días
para el compuesto 24, 4-8 para el compuesto 21, 3-5 para
5 el compuesto 22 y 4-6 para el compuesto 23.



1

REIVINDICACIONES

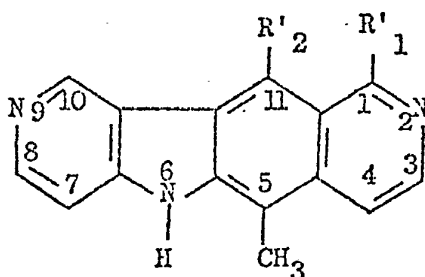
5

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para obtener dipirido [4,3-b] [3,4-f] indoles, que responden a la fórmula:

20



20

en la que R'_1 es hidrógeno, el grupo hidroxilo, un grupo alcoholilo, de preferencia inferior, alcoholitio o alcoxilo, un halógeno o un grupo amino; R'_2 es hidrógeno o un grupo alcoholilo inferior, de preferencia un grupo metilo, y las sales de estos aceptables en farmacia, caracterizado porque consiste: (1) en hacer reaccionar una amino-6-isoquinoleína con nitro-3-cloro-4-piridina, para formar la [(nitro-3'-piridil)-4'-amino]-6-isoquinoleína correspondiente; (2) en hidrogenar dicha isoquinoleína así obtenida al compuesto amino correspondiente; (3) en hacer reaccionar el compuesto amino correspondiente con nitrito sódico, para formar la triazolopiridina correspondiente; (4) en transformar la triazolopiridina así obtenida al dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol correspondiente; (5) en formar eventualmente la sal

25

30

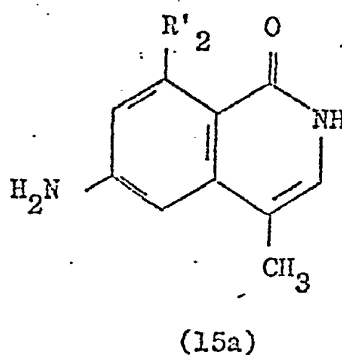
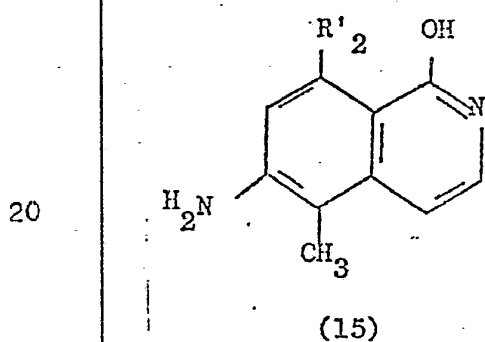
02058

1 aceptable en farmacia del dipiridoindol así obtenido.

2^a.- Procedimiento según la reivindicación 1^a,
 5 caracterizado porque la hidrogenación de la etapa (2) se
 realiza en presencia de un catalizador de hidrogenación,
 tal como carbón con paladio.

3^a.- Procedimiento según una de las reivindica-
 ciones 1^a o 2^a, caracterizado porque la etapa (4) se rea-
 liza en presencia de un agente inerte, tal como parafina
 o fenantreno, de punto de fusión bastante elevado para que
 10 se consiga la reacción por vía térmica.

4^a.- Procedimiento según cualquiera de las rei-
 vindicaciones 1^a a 3^a, caracterizado porque el producto
 de partida de fórmula IV, en la que R'₂ es como se ha de-
 finido en la reivindicación 1^a y R'₁ = OH, es decir, el
 15 compuesto de fórmula 15 o 15a (forma tautómera):



25 se obtiene por el procedimiento que consiste en transformar
 el grupo amino del metil-2-amino-3-benzonitrilo a grupo acetil-
 amino, para formar el compuesto de fórmula 10; en trans-
 formar luego el grupo ciano del metil-2-acetilamino-3-benzo-
 nitrilo a grupo aldehído, y en condensar luego este último
 con ácido malónico, para formar el ácido de fórmula (12);
 30 en formar luego la correspondiente azida (13); en efectuar

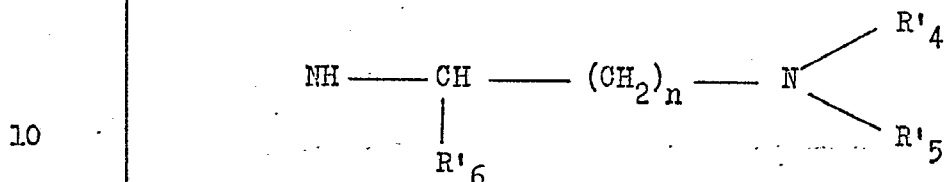
1 una ciclización para formar la isoquinolona correspondiente y, por último, en eliminar el grupo protector del grupo amino, para obtener la metil-5-amino-6-isoquinolona de fórmula (15).

5 5^a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 3^a, caracterizado porque el producto de partida de fórmula IV, en la que R'₁ = OH y R'₂ es tal como se ha definido en la reivindicación 1^a, es decir, los compuestos de fórmulas 15 o 15_a (forma tautómera), se obtiene por el modo de operación que consiste en transformar la metil-2-nitro-3-anilina de fórmula (30) en el ácido (metil-2-nitro-3-fenil)-cloropropiónico de fórmula (31), en transformar este último compuesto al ácido metil-2-nitro-3-cinámico de fórmula (32) por eliminación de HCl, y luego en transformar el grupo nitro de este compuesto a grupo acetilamino, pasando por la etapa de grupo amino (fórmula 10 33), para formar el compuesto de fórmula (12), siendo transformado luego el compuesto de fórmula (12) al compuesto de fórmula 15 o 15_a, según la reivindicación 4^a.

15 6^a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 3^a, caracterizado porque el producto de partida de fórmula IV, en la que R'₁ = OH y R'₂ = CH₃, es decir, los compuestos de fórmulas 15 o 15_a en las que R'₂ = CH₃, caracterizado porque se obtiene por el modo de operación que consiste en transformar el grupo clorometilo del compuesto de fórmula (A) a un grupo aldehído [compuesto de fórmula (B)], en condensar luego este grupo aldehído con ácido malónico, para formar el ácido cinámico de fórmula (C), en reducir luego el grupo nitro del compuesto de fórmula (C) a un grupo amino [compuesto de fórmula (D)].

1 que se transforma luego a grupo acetilamino, para obtener el compuesto de fórmula (12), siendo transformado luego el compuesto de fórmula (12) en el compuesto de fórmula (15) o (15a), según la reivindicación 4ª.

5 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el radical R'₁ es un grupo amino que responde a la fórmula:



15 en la que n está comprendido entre 1 y 3, R'₆ es hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, por ejemplo el grupo CH₃; y R'₄ y R'₅ son idénticos o diferentes, y representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, de preferencia los grupos R'₄ y R'₅ son idénticos y son hidrógeno, el grupo metilo o el grupo etilo.

20 8ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 7ª, caracterizado porque los productos obtenidos son los compuestos siguientes: dimetil-5,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol; diacetato de tetrametil-2,5,9,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indolinio; acetato de dimetil-5,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol; diclorhidrato de dimetil-5,11-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol; di-
25 hidro-1,2-oxo-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol; cloro-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol; (γ-dietilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol; (γ-dimetilaminopropil)-amino-1-metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol; (β-dimetilaminoetil)-amino-1-
30 -metil-5-dipirido [4,3-b] [3,4-f] indol; (α-metil-

1 δ -dietilaminobutil)-amino]-1-metil-5-dipirido[4,3-b]
 [3,4-f]indol, [(γ -aminopropil)-amino]-1-metil-5-di-
 pirido [4,3-b][3,4-f] indol y dihidro-1,2-oxo-1-dime-
 til-5,11-dipirido [4,3-b][3,4-f] indol.

5 9ª.- Procedimiento según cualquiera de las rei-
 vindicaciones 1ª a 7ª, caracterizado porque los compues-
 tos intermedios son los compuestos siguientes: metil-2-
 -acetilamino-3-benzaldehido; ácido metil-2-acetilamino-
 -3-cinámico; metil-2-acetilamino-3-cinamoilazida; hidroxil-
 10 -1-metil-5-acetilamino-6-isoquinoleína; hidroxil-1-metil-
 -5-amino-6-isoquinoleína y su forma tautómera; dimetil-
 -2,5-nitro-3-benzaldehido; ácido dimetil-2,5-nitro-3-trans-
 -cinámico, ácido dimetil-2,5-acetilamino-3-trans-cinámi-
 co; ácido dimetil-2,5-amino-3-trans-cinámico; dimetil-2,5-
 15 -acetilamino-3-trans-cinamoilazida; dihidro-1,2-oxo-1-dime-
 til-5,8-acetilamino-6-isoquinoleína; dihidro-1,2-oxo-1-di-
 metil-5,8-amino-6-isoquinoleína; dimetil-5,8-(nitro-3'-
 -piridil)-4'-amino]-6-isoquinoleína; dihidro-1,2-oxo-1-
 -dimetil-5,8-(amino-3'-piridil)-4'-amino]-6-isoquinolei-
 20 na; [(dihidro-1',2'-oxo-1'-dimetil-5',8'-isoquinolil)-6']-
 -1-triazol (4,5c) piridina y sus formas tautómeras cuando
 existen, ácido (metil-2-nitro-3-fenil)-cloropropiónico, áci-
 do metil-2-nitro-3-cinámico.

25 10ª.- Procedimiento para obtener dipirido [4,3-b]
 [3,4-f]-indoles.

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

Esta Memoria consta de noventa y una hojas
escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 11. MAY 1978

P.A.

Alberto de Elzuru
For...
