

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

AH



ESPAÑA

Concedido el Registro ⁽¹¹⁾ **ES** ⁽¹²⁾ **es** ⁽¹³⁾ **es** ⁽¹⁴⁾ **es** ⁽¹⁵⁾ **es** ⁽¹⁶⁾ **es** ⁽¹⁷⁾ **es** ⁽¹⁸⁾ **es** ⁽¹⁹⁾ **es** ⁽²⁰⁾ **es** ⁽²¹⁾ **es** ⁽²²⁾ **es** ⁽²³⁾ **es** ⁽²⁴⁾ **es** ⁽²⁵⁾ **es** ⁽²⁶⁾ **es** ⁽²⁷⁾ **es** ⁽²⁸⁾ **es** ⁽²⁹⁾ **es** ⁽³⁰⁾ **es** ⁽³¹⁾ **es** ⁽³²⁾ **es** ⁽³³⁾ **es** ⁽³⁴⁾ **es** ⁽³⁵⁾ **es** ⁽³⁶⁾ **es** ⁽³⁷⁾ **es** ⁽³⁸⁾ **es** ⁽³⁹⁾ **es** ⁽⁴⁰⁾ **es** ⁽⁴¹⁾ **es** ⁽⁴²⁾ **es** ⁽⁴³⁾ **es** ⁽⁴⁴⁾ **es** ⁽⁴⁵⁾ **es** ⁽⁴⁶⁾ **es** ⁽⁴⁷⁾ **es** ⁽⁴⁸⁾ **es** ⁽⁴⁹⁾ **es** ⁽⁵⁰⁾ **es** ⁽⁵¹⁾ **es** ⁽⁵²⁾ **es** ⁽⁵³⁾ **es** ⁽⁵⁴⁾ **es** ⁽⁵⁵⁾ **es** ⁽⁵⁶⁾ **es** ⁽⁵⁷⁾ **es** ⁽⁵⁸⁾ **es** ⁽⁵⁹⁾ **es** ⁽⁶⁰⁾ **es** ⁽⁶¹⁾ **es** ⁽⁶²⁾ **es** ⁽⁶³⁾ **es** ⁽⁶⁴⁾ **es** ⁽⁶⁵⁾ **es** ⁽⁶⁶⁾ **es** ⁽⁶⁷⁾ **es** ⁽⁶⁸⁾ **es** ⁽⁶⁹⁾ **es** ⁽⁷⁰⁾ **es** ⁽⁷¹⁾ **es** ⁽⁷²⁾ **es** ⁽⁷³⁾ **es** ⁽⁷⁴⁾ **es** ⁽⁷⁵⁾ **es** ⁽⁷⁶⁾ **es** ⁽⁷⁷⁾ **es** ⁽⁷⁸⁾ **es** ⁽⁷⁹⁾ **es** ⁽⁸⁰⁾ **es** ⁽⁸¹⁾ **es** ⁽⁸²⁾ **es** ⁽⁸³⁾ **es** ⁽⁸⁴⁾ **es** ⁽⁸⁵⁾ **es** ⁽⁸⁶⁾ **es** ⁽⁸⁷⁾ **es** ⁽⁸⁸⁾ **es** ⁽⁸⁹⁾ **es** ⁽⁹⁰⁾ **es** ⁽⁹¹⁾ **es** ⁽⁹²⁾ **es** ⁽⁹³⁾ **es** ⁽⁹⁴⁾ **es** ⁽⁹⁵⁾ **es** ⁽⁹⁶⁾ **es** ⁽⁹⁷⁾ **es** ⁽⁹⁸⁾ **es** ⁽⁹⁹⁾ **es** ⁽¹⁰⁰⁾ **es**

NUMERO	476.153
FECHA DE PRESENTACION	19-12-78

(10) A1

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
861,732	19-12-77	Estados Unidos
944,434	21-9-78	" "
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C/B01A	
(54) TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR NUEVOS COMPUESTOS DE 2-ARIL-1H-PERIMIDINA.		
(71) SOLICITANTE (S)		
ELI LILLY AND COMPANY		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
307 East McCarty Street - Indianapolis, Indiana 46206 - ESTADOS UNIDOS.		
(72) INVENTOR (ES)		
Ken Matsumoto, de nacionalidad estadounidense.		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

1 Esta invención se refiere a un procedimiento para preparar nuevos compuestos de 2-aril-1H-perimidina y a sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 La técnica anterior ha dado a conocer los compuestos de 1H-perimidina 2-sustituídos y los compuestos de 2,3-dihidro-1H-perimidina 2-sustituídos que difieren de los compuestos de la presente invención.

10 Un artículo en el Proc. Am. Assn. Cancer Res. 3, 319 (1962) da a conocer la actividad carcinostática de "2-(3,4-diclorofenil)-1H-benzo(de)-quinazolina" el mismo compuesto que la 2-(3,4-diclorofenil)-1H-perimidina, en el sistema de nomenclatura utilizado en la presente solicitud. La referencia expresamente establece que el compuesto "no es activo oralmente".

15 Un artículo en J. Het. Chem., 1, 108 (1964) es un estudio siguiente inspirado por el artículo anterior. En este estudio, se sintetizó una serie de 2-aril-2,3-dihidro-1H-perimidinas. Dentro de esta serie estuvieron:

2-(p-clorofenil)-2,3-dihidro-1H-perimidina

20 2-(3,4-diclorofenil)-2,3-dihidro-1H-perimidina

2-(p-bromofenil)-2,3-dihidro-1H-perimidina.

La referencia no hace mención a ninguna utilidad de estos compuestos.

25 Sin embargo, la utilidad de esta serie anterior se da a conocer en J. Med. Chem. 9(4) 599 (1966), Los tres compuestos en cuestión exhibieron una actividad antineoplástica ligera.

30 El artículo en J. Org. Chem. 36, No. 11, 1477 (1971) describe, entre otras cosas 1H-perimidinas 2-sustituídas y las sales p-toluensulfonato de las mismas, incluyendo la 2-

1 fenil-1H-perimidina, 2-(p-clorofenil)-1H-perimidina y 2-(p-
metilfenil)-1H-perimidina, y sus sales p-toluensulfonato. Es
ta referencia no hace mención a la utilidad. Similarmente,
el artículo en Reakts. Sposobnost' Org. Soedin, 6(1) 47-54
5 (1969) (Eng.) describe la 2-fenil-1H-perimidina, la 2-(p-to-
lil)-1H-perimidina, la 2-(bromofenil)-1H-perimidina y la 2-
(m-bromofenil)-1H-perimidina, pero no enseña su utilidad.

Ambas de las siguientes referencias están relaciona
das principalmente con una síntesis nueva para producir peri
midinas 1,2-disustituídas.
10

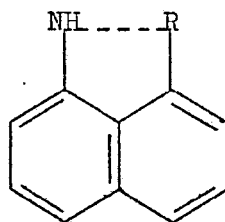
La Patente de la U.R.S.S. 504.770 se refiere a pe-
rimidinas "... que poseen actividad biológica y que pudieran
encontrar aplicación en medicina", pero no existen notas al
pie a las referencias que certifiquen este comentario; y pa-
15 recería que se refiere únicamente a los compuestos 1,2-disus-
tituídos.

Khim. Farm. Zhur. 11 (5) 87-93 (1977) describe la
actividad sobre el sistema nervioso central de las perimidi-
nas 1,2-disustituídas y la 2-(3,4-dimetoxifenil)perimidina.

20 Los compuestos de la presente invención difieren de
los compuestos de estas referencias porque no están sustituí-
dos en la posición, 1, y los compuestos reivindicados difie-
ren por llevar otros sustituyentes en el anillo de fenilo.
Además, la presente invención está relacionada con la supre-
25 sión de la respuesta inmune de los mamíferos, una utilidad no
sugerida por la actividad carcinoestática o sobre el sistema
nervioso central.

La presente invención se refiere a un procedimien-
to para preparar nuevos compuestos de 2-aril-1H-perimidina
de fórmula general:
30

1



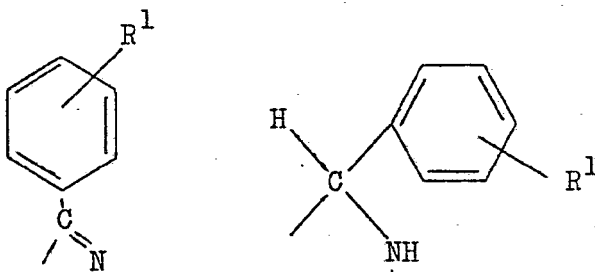
I

5

en donde:

R es

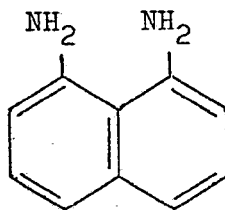
10



15

en donde R¹ es un grupo -CF₃, OCF₃, -SCF₃ o -OC₂F₅ colocado en meta o en para, y sus sales farmacéuticamente aceptables, que se caracteriza mediante la condensación de 1.8-diaminonaf taleno.

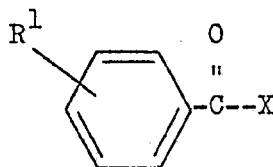
20



IV

con un compuesto de acilo de la fórmula

25



V

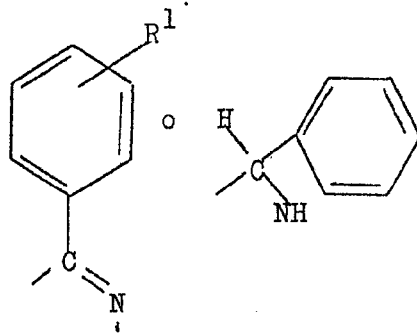
30

en donde R¹ se define como antes, y X es flúor, cloro, bromo o hidrógeno.

1

En la fórmula I, el átomo de carbono de la unidad

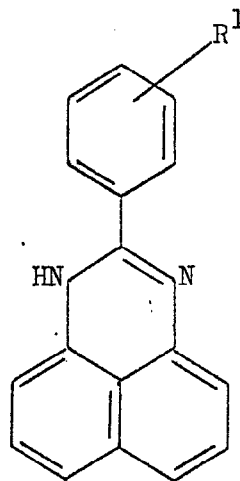
5



10

R^1 está siempre intermedio a los dos átomos de nitrógeno, de manera que, la fórmula I representa únicamente dos tipos de estructuras:

15

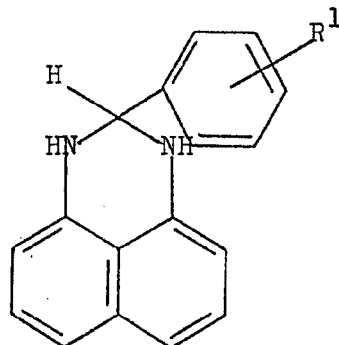


II

20

y

25



III

30

1 en donde R^1 se define como antes.

Los compuestos de la fórmula II se preparan cuando X es flúor, cloro o bromo; los compuestos de la fórmula III se preparan cuando X es hidrógeno. Dirigir la atención a J. Het. Chem. 1, 108 (1964), J. Org. Chem. 36 (11), 1477 (1971) y las referencias citadas en cada uno.

La mayoría de los compuestos de fórmula V, que se emplean como materiales de partida son compuestos conocidos, y todos se preparan mediante procedimientos convencionales. Los fluoruros de m- y p-trifluorometoxibenzoílo, se preparan clorando un m- o p-metoxibenzoato de alquilo, y haciendo reaccionar el cloruro de m- o p-triclorometoxibenzoílo con una mezcla de SbF_3 y $SbCl_5$. Los cloruros de m- y p-trifluorometiltiobenzoílo se preparan haciendo reaccionar un m- o p-yodobenzoato de alquilo con $Hg(SCF_3)_2$, hidrolizando el m- o -trifluorometiltiobenzoato de alquilo resultante, y convirtiendo el ácido libre a un cloruro de ácido, v.gr. $SOCl_2$. Los cloruros de m- y p-pentafluorettoxibenzoílo se preparan como sigue: se acila m- o p-bromofenol con anhídrido trifluoracético para producir trifluoracetato de m- o p-bromofenilo, que se hace reaccionar con SF_4 para obtener bromuro de m- o p-pentafluorettoxifenilo. Este se convierte al ácido correspondiente mediante reacción con butil litio y CO_2 , convirtiéndose al cloruro de acilo con $SOCl_2$. Los aldehídos correspondientes, que van a utilizarse en la preparación de los compuestos de fórmula III, se preparan a partir de los halogenuros de acilo, mediante procedimientos convencionales.

Los compuestos de fórmula I, son útiles para suprimir la reacción inmune en los mamíferos. Dicha supresión incluye la supresión de la respuesta inmune engendrada siempre

1 que el cuerpo del mamífero forme anticuerpos y células reac-
tivas en respuesta a la presencia de la proteína extraña. La
aplicación práctica de la actividad inmunosupresora es varia
da. Una aplicación prominente de actividad inmunosupresora
5 está en el transplante de órganos; sin embargo la actividad
inmunosupresora puede emplearse ventajosamente en la terapia
de las diversas enfermedades conocidas colectivamente como
enfermedades de "auto-inmunidad". Las enfermedades represen
tativas de autoinmunidad incluyen la anemia hemolítica auto-
10 inmune, la púrpura trombocitopénica idiopática, el lupus eri
tematoso, la heptitis lupoides, la nefritis lupus, la glomeru
lofritis, el síndrome nefrótico, el síndrome Goodpasture, la
granulomatosis de Wegener, la esqueleroqueratosis, la enfermedad
de Sezary, la psoriasis, la uveítis, la artritis reumatoide,
15 la colitis ulcerante, la tiroiditis, y la orquitis parotiditi
tis.

La administración de los compuestos de fórmula I,
puede ser mediante las rutas oral y parenteral. La cantidad
precisa de agente activo que va a emplearse varía de compues
20 to a compuesto. Sin embargo, los compuestos tienen un índice
terapéutico elevado, de manera que las dosis no tóxicas, efec
tivas, en cada caso, se extienden sobre una amplia escala.
Dependiendo del sistema de prueba, esta escala para los miem
bros más activos de la serie probada en pequeños mamíferos,
25 se extiende de menos de 1,6 a 25 mg/kg/día. Otros compuestos
de la serie requieren de más, tal como de 100 mg/kg/día o
más, en mamíferos pequeños. Dada la relación entre las dosis
para animales pequeños y grandes con otros medicamentos -y.
gr, la dosis humana del inmunosupresor, la azatioprina es ge
30 neralmente de 1-2 mg/kg. mientras que la dosis en el ratón

1 es de aproximadamente 50 mg/kg. (ver también Cancer Chemo-
therapy Reports 50:219; 1966).- los niveles de dosis efecti-
vos previstos en seres humanos serían correspondientemente
inferiores que en los pequeños mamíferos tal como de 0,1 a
5 10 mg/kg/día.

Los compuestos de fórmula I, se administran general-
mente en forma de una formulación farmacéutica. Las formula-
ciones farmacéuticas son bien conocidas en la técnica farma-
céutica. Para hacer una formulación con el agente activo pre-
10 sente de fórmula I, el compuesto de selección se mezcla con
un portador tal como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol,
manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, algina-
tos, tragacanto, gelatina, metilcelulosa, talco, estearato
de magnesio u aceite mineral. La formulación puede preparar-
15 se como tableta, suspensión o cápsula. Para uso parenteral,
los compuestos se formulan como soluciones inyectables.

Una formulación preferida es aquella en forma de
unidad de dosis, adaptada para administración oral, para ob-
tener un efecto inmunosupresor, que comprende, por unidad de
20 dosis, una cantidad no tóxica, inmunosupresora, dentro de la
escala de aproximadamente 10 a 1000 mg. del agente activo
presente, y un diluyente farmacéutico.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente inven-
ción.

25 EJEMPLO 1: PREPARACION DE CLORHIDRATO DE 2-(p-TRIFLUORMETIL-
FENIL)-1H-PERIMIDINA

Una solución de 31,64 g. (0,20 moles) de 1,8-diami-
nonaftaleno en 500 ml. de benceno y una solución de 20,8 g.
(0,20 moles) de cloruro de p-trifluormetilbenzoílo en 500 ml.
30 de benceno, se agregaron simultáneamente a 500 ml. de benceno,

1 con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Después de
agitar durante aproximadamente media hora, el sólido se reco
gió y se trituró con metanol, para producir 24,6 g. como sal
clorhidrato (35% de rendimiento), p.f. 210°C. (desc.), espec
5 tro de masas m/e 312.

Análisis, Calculado para $C_{18}H_{12}N_2ClF_3$:

C, 61,99; H, 3,47; N, 8,03; Cl, 10,17; F, 16,34.

Encontrado: C, 61,75; H, 3,59; N, 8,02; Cl, 10,45;

F, 16,70.

10 EJEMPLO 2: PREPARACION DE CLORHIDRATO DE 2-(m-TRIFLUORMETIL-
FENIL)-1H-PERIMIDINA.

Se hicieron reaccionar 1,8-diaminonaftaleno (15,82
g.; 0,10 moles) y cloruro de m-trifluormetilbenzoilo (20,8
g.; 0,10 moles), con las mismas condiciones del Ejemplo 1,
15 produciendo 33,3 g. (95,4% de rendimiento) de clorhidrato de
2-(m-trifluormetilfenil)-1H-perimidina, p.f. 280°C. (desc).
espectro de masas m/e 312.

Análisis calculado para $C_{18}H_{12}N_2ClF_3$:

C, 61,99; H, 3,47; N, 8,03.

20 Encontrado: C, 61,68; H, 3,59; N, 8,13.

EJEMPLO 3: PREPARACION DE FLUORHIDRATO DE 2-(p-TRIFLUORMETOXI
FENIL)-1H-PERIMIDINA.

Se disolvieron 1,8-diaminonaftaleno (1,52 g.;
0,0096 moles) en 25 ml. de tolueno, decantándose después. Se
25 disolvió fluoruro de p-trifluormetoxibenzoilo (2,0 g.; 0,0096
moles) en 25 ml. de tolueno. Ambas soluciones se agregaron si
multáneamente en 25 ml. de tolueno. Después de que se hubo
agitado la mezcla de reacción durante aproximadamente 4 horas
la cromatografía en capa fina indicó que la reacción fué com
30 pleta.

1 La mezcla de reacción se filtró y el producto, un sólido amarillo se secó, 2,72 g. (81,4% de rendimiento), p.f. 195°C. (desc.), espectro de masas m/e 328 con máximos pequeños a 361 indicando cantidades trazo de -OFC1₂.

5 Análisis calculado para C₁₈H₁₂F₄N₂O:
C, 62,07; H, 3,47; N, 8,04; F, 21,82.
Encontrado: C, 61,81; H, 3,58; N, 8,12; F, 21,59.

EJEMPLO 4: PREPARACION DE CLORHIDRATO DE 2-(p-TRIFLUORMETILTIOFENIL)-1H-PERIMIDINA.

10 Se hicieron reaccionar 1,8-diaminonaftaleno (14,59 g.; 0,092 moles) y cloruro de p-trifluormetiltiobenzóilo (22,2 g.; 0,092 moles en las mismas condiciones que el ejemplo 3, produciendo 31,86 g. de producto (91,0% de rendimiento), p.f. 276°C. (desc.), espectro de masas m/e 344. Esto se suspendió en 500 ml. de tolueno y se agitó durante aproximadamente 2 horas, separándose después por filtración, 30,6 g. (87,4% de rendimiento), p.f., 270°C. (desc.). Esto se suspendió entonces en 750 ml. de tolueno, se hirvió durante 2 horas, y se separó mediante filtración 29,7 g. (84,8% de rendimiento).

20 Análisis calculado para C₁₈H₁₂ClF₃N₂S:
C, 56,77; H, 3,18; N, 7,36.
Encontrado: C, 57,57; H, 3,37; N, 7,40.

EJEMPLO 5: PREPARACION DE CLORHIDRATO DE 2-(p-PENTAFLUORETOXIFENIL)-1H-PERIMIDINA.

25 Se hicieron reaccionar 1,8-diaminonaftaleno (1,04 g; 0,00656 moles) y cloruro de p-pentafluorettoxibenzóilo (1,8 g.; 0,00656 moles), en las condiciones del Ejemplo 3, produciendo 2,25 g. de producto (82,7% de rendimiento), p.f. 240°C. (desc.) espectro de masas m/e 378.

30

1 Análisis calculado para $C_{19}H_{12}ClF_5N_2O$:
 C, 55,02; H, 2,92; N, 6,75; F, 22,90.

 Encontrado: C, 54,82; H, 3,15; N, 6,49; F, 23,20.

5 EJEMPLO 6: PREPARACION DE 2,3-DIHIDRO-2-(p-TRIFLUORMETILFENIL)-1H-PERIMIDINA.

 Se puso a reflujo durante 24 horas una solución que contiene 15,8 g. (0,10 moles) de 1,8-diaminonaftaleno, 17,4 g. (0,10 moles) de p-trifluorometilbenzaldehído, y 1 litro de xileno. El disolvente se evaporó a vacío para producir 37,5 g. del producto bruto, el cual se purificó sobre gel de sílice y se eluyó con tolueno, produciendo 22,93 g. (73% de rendimiento) del producto. P.f. 119-22°C., espectro de masas m/e 314.

15 Análisis calculado para $C_{18}H_{13}N_2F_3$:
 C, 68,78; H, 4,17; N, 8,91.

 Encontrado: C, 68,69; H, 4,40; N, 9,11.

 EJEMPLOS 7-20: ANALISIS DE HEMAGLUTININA EN RATON, ADMINISTRACION ORAL.

20 Grupos de cinco ratones suizos criados al azar, machos, de 20 gr., recibieron inyecciones intravenosas de 5×10^7 glóbulos rojos de ovejas. Los glóbulos para estas inyecciones se prepararon a partir de sangre de borrego (recogida en solución de Alsever), lavando tres veces con solución salina al 0,85 por ciento, y volviendo a suspender en solución salina al 0,85 por ciento. Se administraron oralmente
25 nueve dosis diarias de cada compuesto que va a probarse, solubilizadas en polietilenglicol 400, en dosis de 0,1 ml., comenzando tres días antes de la inyección de los glóbulos rojos. Se emplearon varios niveles de dosis de cada compuesto
30 a incrementos del doble. Se inculó un grupo de control de

1 ratones, que reciben una inyección de glóbulos rojos y 9 do-
sis diarias de vehículo en lugar del medicamento. Seis días
después de las inyecciones de antígeno, los ratones se san-
graron mediante punción cardíaca y se combinaron los sueros
5 de cada grupo de cinco ratones. Los combinados de suero, si-
guiendo una combinación complementaria, se analizaron en cuan-
to a contenido de hemaglutinina, mediante procedimientos nor-
males, utilizando una mezcla de diluciones salinas al doble,
10 en serie de los sueros de prueba con suspensiones de glóbu-
los rojos de ovejas al 0,5 por ciento en cubetas cóncavas de
plástico. Después de la incubación de las cubetas durante 3
horas a 37°C., se clasificaron los patrones de hemaglutina-
ción. Una reducción de anticuerpo del cuádruple (75 por cien-
to) o mayor (en el suero de prueba según se compara con el
15 suero de control) se consideró significativo. Los resultados
se expresaron como dosis efectiva mínima ("DEM") la dosis de
medicamento más baja produciendo 75 por ciento o más de re-
ducción de anticuerpo.

Los resultados de la prueba de perimidina de fórmu-
20 la I, en cuanto a su capacidad para reducir la producción de
anticuerpo, se resumen en la tabla I. La azatioprina (IMURAN)
que se utiliza para inmunosupresión clínica, tienen un DEM
de 100 mg/kg x 9 mediante esta prueba.

TABLA I

25	Compuesto	DEM mg/kg x 9 Oral
	clorhidrato de 2-(p-trifluor metilfenil)-1H-perimidina	6,25
30	Clorhidrato de 2-(m-trifluor metilfenil)-1H-perimidina	100

1

TABLA I (continuación)

<u>Compuesto</u>	<u>DEM</u> <u>mg/kg x 9 Cral</u>
fluorhidrato de 2-(p-trifluor metoxifenil)-1H-perimidina	100
clorhidrato de 2-(p-trifluor- metiltiofenil)-1H-perimidina	100
clorhidrato de 2-(p-pentafluor etoxifenil)-1H-perimidina	100

5

EJEMPLOS 21-25: PROCEDIMIENTO DE ANALISIS DE SUERO INDIVIDUAL.

10

En estas pruebas el procedimiento descrito anteriormente en los ejemplos 7-20 se modifica mediante el empleo de grupos de 10 ratones, en lugar de grupos de 5 ratones. Los ratones se sangraron como antes, pero los sueros fueron titulados individualmente en lugar de en forma combinada. Se calcularon los valores de hemaglutinina promedio (\log_2) \pm S.E. por cada grupo de 10 ratones, y se determinaron los valores p (mediante prueba de Student) en comparación con el grupo de control. La dosis de medicamento más baja disminuye significativamente ($P < 0,05$) el título del anticuerpo definido por el punto final. Los medicamentos se administraron oral o subcutáneamente en dosis de diez días, comenzando tres días antes de la inyección de glóbulos rojos. Los medicamentos se suspendieron en un vehículo compuesto de solución salina que contiene 0,125 por ciento de metilcelulosa y 0,2 por ciento de un agente emulsionante no iónico. Se hicieron determinaciones de anticuerpo (hemaglutinina) siete días después de la inyección de glóbulos rojos. Los resultados típicos obtenidos en la prueba del análisis de suero individual con compuestos representativos de fórmula I, se resumen en la Tabla II.

15

20

25

30

1

TABLA II

Actividad inmunosupresora de los compuestos
(Procedimiento de análisis de suero individual).

5

Compuesto	Vía	Dosis punto final (p menor que 0,05) en mg/kg y 10.
-----------	-----	---

Clorhidrato de 2-(p-trifluor metilfenil)-1H-perimidina	Oral	< 1,6
	Subcut.	< 1,6

Fluorhidrato de 2-(p-trifluor metoxifenil)-1H-perimidina	Oral	12,5
---	------	------

10

Clorhidrato de 2-(p-trifluor metiltiofenil)-1H-perimidina	Oral	50
--	------	----

EJEMPLOS 26-27: REACCION DE INJERTO VERSUS HUESPED (GVH).

15

En esta prueba se inyectan parenteralmente células de bazo de ratón (C57BL) a ratones de una cepa híbrida F₁ (C57BL x C3H). El ratón recipiente no rechaza las células de bazo inyectadas, ya que el híbrido reconoce los antígenos relacionados con el C57BL de su padre homocigótico, como "propios". Las células inyectadas, sin embargo, provocan una reacción en el tejido del recipiente debido a los antígenos derivados del C3H extraño. Como consecuencia, el bazo del recipiente se empieza a agrandar. La inmunosupresión evita o reduce este aumento. De esta manera, los pesos de los bazos proporcionan una medida de la reacción GVH y su reducción bajo inmunosupresión.

20

25

Se empleó una modificación del procedimiento original de Simonsen (Ann. N. Y. Acad. Sci. 73:834, 1958). Se obtuvieron grandes cultivos de células de bazo, sin desgarre manual generalmente empleado de los bazos mediante el empleo de mezcladores Waring, con las hojas de corte invertidas. Dos períodos de mezcla de seis segundos golpearon los bazos (cargas de 25 bazos C57BL en 25 ml. de solución salina) sufi

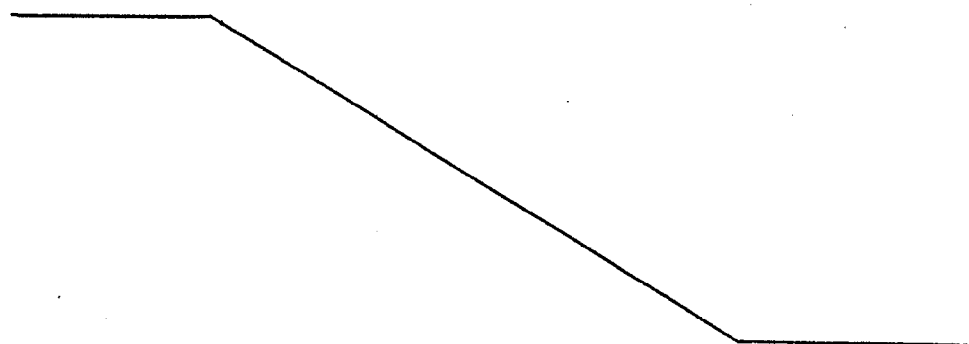
30

1 cientemente para liberar las células del tejido conectivo.
Las últimas se separaron mediante filtración a través de va-
rios espesores de estopilla de algodón. Las suspensiones de
células preparadas en esta forma se estandarizaron, por medio
5 de cuentas en una cámara de Levy-Hausser, para contener 6×10^8
 10^8 células nucleadas por ml. Se inyectaron intraperitoneal-
mente a grupos de diez ratones de 16-18 g. C57BL x C3H, con
1 ml. de la suspensión de células del donador. El tratamien-
to, mediante la vía oral o subcutánea en 0,2 ml., se institu-
10 yó 3 días antes de la inyección de las células, y se conti-
nuó directamente durante 13 días. Los animales de control re-
cibieron únicamente células y vehículo. Se separaron los ba-
zos y se pesaron 10 días después de la inyección de las célu-
las. Los resultados se expresaron como mg. de bazo/gramo de
15 peso del cuerpo.

Ya que la inyección de singeneico, esto es, C57BL
x C3H, las células en el ratón recipiente producen un grado
menor de esplenomegalia, los pesos de los bazos de dichos
animales, se utilizaron para definir una supresión al 100%
20 del componente de GVH para calcular los porcentajes de inhi-
bición producidos por los compuestos inmunosupresores. El mé-
todo de cálculo se ilustra en el siguiente ejemplo de rato-
nes tratados con un compuesto inmunosupresor de referencia:

25

30



Compuesto de referencia	mg. del bazo/g de peso del cuerpo + S.E.*	Porcentaje de inhibición**
1-(6-metoxi-2-benzotiazolil)- 2-fenilurea (ver J. Mod. Chem. 12, 1016- 1018 (1969), 12,5 mg/kg x 13 (oralmente)	5,86 ± 0,80 ***	74
Ninguno (Control GVH)	11,55 ± 1,01	0
Ninguno (Control Sin.)	5,20 ± 0,37	100
Ninguno (Control normal)	4,16 ± 0,17	--

* Valores promedio de grupos de 5 ratones.

** $\frac{(\text{Control GVH} - \text{Tratado})}{(\text{Control GVH} - \text{Control Sin.})}$ X = Porcentaje de inhibición.

*** p < 0,01, comparado con el control GVH.

referencia	mg. del bazo/g de peso del cuerpo + S.E.*	Porcentaje de inhibición**
-benzctiazolil)- hem. 12, 1016- 12,5 mg/kg x 13	5,86 ± 0,80 ***	74
rol GVH)	11,55 ± 1,01	0
rol Sin.)	5,20 ± 0,37	100
rol normal)	4,16 ± 0,17	--

ores promedio de grupos de 5 ratones.

$\frac{\text{Control GVH - Tratado}}{\text{Control GVH - Control Sin.}}$ } X = Porcentaje de inhibición.

0,01, comparado con el control GVH.

1 Ya que en la práctica se encontró que tanto los
controles sinérgico como normal únicamente variaron en for
ma ligera de prueba a prueba, se utilizó un valor compuesto
(4,8), derivado de un nuevo cálculo de cuatro grupos de con-
5 trol sinérgico separados ($5,20 \pm 0,37$, $4,99 \pm 0,39$, $4,42 \pm$
 $0,13$, $4,66 \pm 0,12$), con un grupo de 20 ratones, en los cálcu
los. Los resultados obtenidos en la reacción de transplante
versus huésped con los compuestos de fórmula I, se resumen
en la Tabla III.

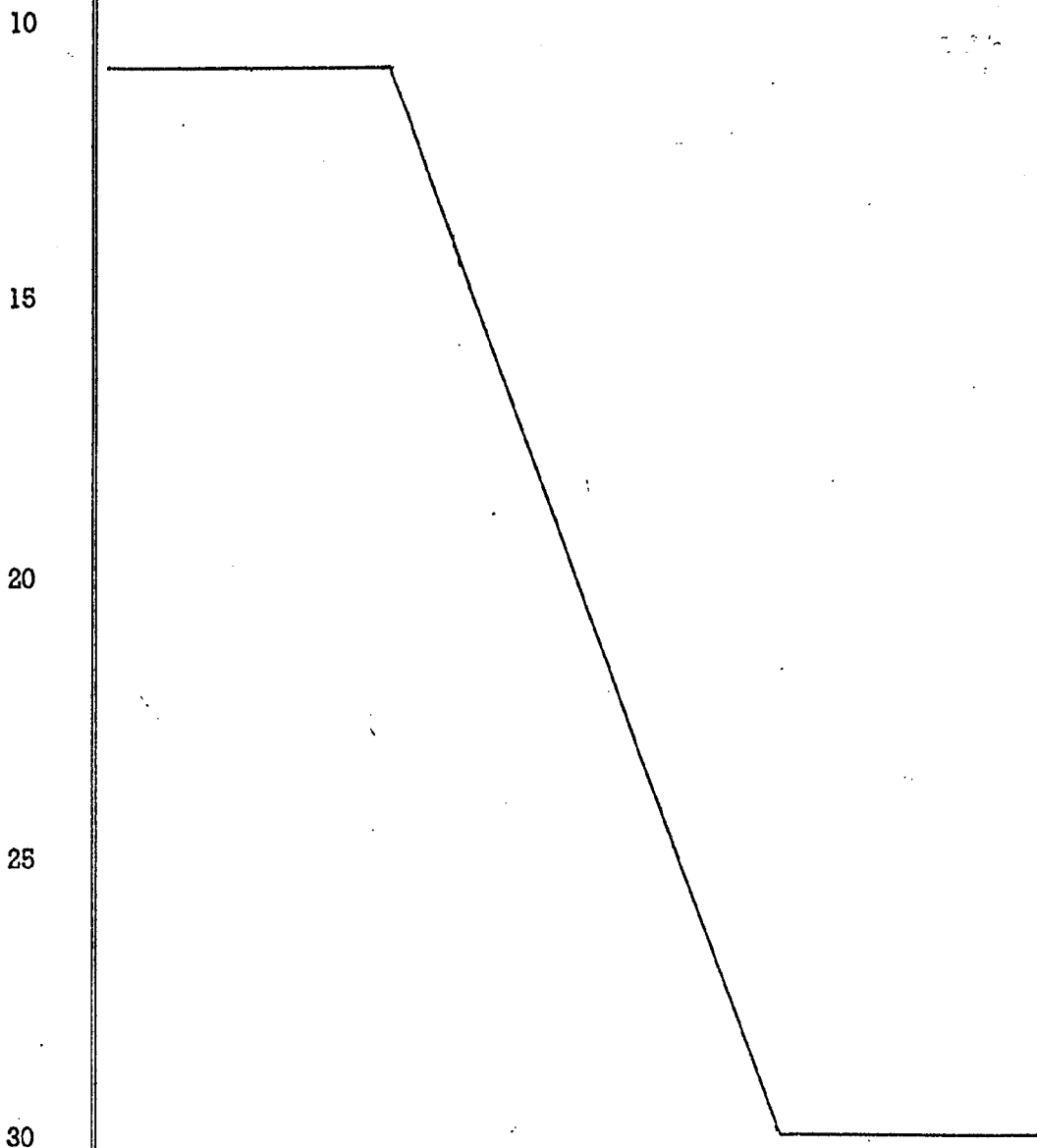


TABLA III

Efecto de los compuestos sobre la Reacción GVH

Compuesto	Dosis (mg/kg x 13)	Mg de bazo/g de pesc del ratón (medio + S.E.)	Porcentaje de inhibición Serie GVH
Clorhidrato de 2-(p- trifluorometilfenil)- 1-H-perimidina (Oral)	25	4,75 ± 0,42 ^c	101
	12,5	6,62 ± 1,17	53
	6,2	5,57 ± 0,51 ^e	77
	3,1	4,96 ± 0,31 ^d	96
	1,6	5,66 ± 0,33 ^e	78
-- (Control)	---	8,64 ± 1,10	

1

5

10

15

20

25

30

1

TABLA III

5

Efecto de los compuestos sobre la

Mg de bazo/g de
peso del ratón
(medio + S.E.)

Compuesto

Dosis
(mg/kg x 13)

10

Clorhidrato de 2-(p-
trifluorometilfenil)-
1-H-perimidina (Oral)

25

4,75 ± 0,42^c

12,5

6,62 ± 1,17

6,2

5,67 ± 0,51^e

3,1

4,96 ± 0,31^d

1,6

5,66 ± 0,33^e

15

-- (Control)

8,64 ± 1,10

20

25

30

TABLA III

Efecto de los compuestos sobre la Reacción GVH

<u>Dosis</u> (mg/kg x 13)	<u>Mg. de bazo/g de</u> <u>peso del ratón</u> (medio + S.E.)	<u>Porcentaje de</u> <u>inhibición</u> <u>Serie GVH</u>
2-(p- nil)- (Oral)		
25	4,75 ± 0,42 ^c	101
12,5	6,62 ± 1,17	53
6,2	5,67 ± 0,51 ^e	77
3,1	4,96 ± 0,31 ^d	96
1,6	5,66 ± 0,33 ^e	78
---	8,64 ± 1,10	

- 1 a $\left(\frac{\text{Control GVH - Tratado}}{\text{Control GVH - Control Sin.}} \right) X = \text{Porcentaje de inhibición}$
b. $p < 0,001$
c. $p < 0,005$
d. $p < 0,01$
5 e. $p < 0,05$

EJEMPLO 28: PRUEBA DE ARTRITIS INDUCIDA POR UN COADYUVANTE EN RATAS.

10 Se probó clorhidrato de 2-(p-trifluorometilfenil)-1H-perimidina, en cuanto a su capacidad para alterar el hinchamiento de la pata trasera y el daño del hueso que resulta del edema producido por un coadyuvante en la rata. A fin de cuantificar la inhibición del hinchamiento de la pata trasera que resulta de la artritis inducida con un coadyuvante, se han definido dos fases de inflamación: (1) la pata trasera inyectada primaria y secundaria, y (2) la pata trasera no inyectada secundaria, que generalmente se empieza a desarrollar aproximadamente nueve días después de la inducción de la inflamación en la pata inyectada. La reducción del último tipo de inflamación es una indicación de la actividad inmunosupresora. Ver Chang, Arth, Rheum, 20: 1135-1141 (1977). Se incluyó fenoprofen (30 mg./kg) como un compuesto antiinflamatorio normal para valoración comparativa (Nickander y otros, Fed. Proc. Annual FASEB Mtgs., Abril, 1971, ABS #205).

25 La artritis por coadyuvante se indujo en ratas Lewis-Wistar macho (200-210 gramos) en una inyección subplantar individual a la pata trasera derecha de 0,1 ml. de una suspensión al 0,5% de Mycobacterium tuberculosis (Calbiochem-Perrigen-C) liofilizada exterminada con calor, en aceite mineral, (una modificación de un método dado a conocer por Winter y col., Arth. Rheum. 9: 394-397 (1966). Un grupo de 30

1 ratas ("Control TB") recibió únicamente este tratamiento.
Otro grupo de 5 ratas no recibió tratamiento (Control normal)
Cada compuesto que va a probarse, se suspendió en carboxime-
tilcelulosa (1%), y se administró mediante alimentación for-
5 zada a ratas (grupos de 5 cada uno) en dosis orales diarias
de 30 mg/kg., empezando el día uno, continuándose a través
de 17 días después de la inyección del coadyuvante (17 dosis).
Se midieron los volúmenes de la pata mediante el desplaza-
miento de mercurio, utilizando un transductor de presión
10 Statham y un voltímetro digital. Los volúmenes de las patas
traseras tanto la inyectada como la no inyectada, se midie-
ron en los días 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18. Se tomaron fo-
tos de rayos X en el décimo octavo día después de que se sa-
crificaron los animales. Las medidas del volumen de la pata
15 en la pata no inyectada empezando el día 9 al día 18, fueron
los siguientes.

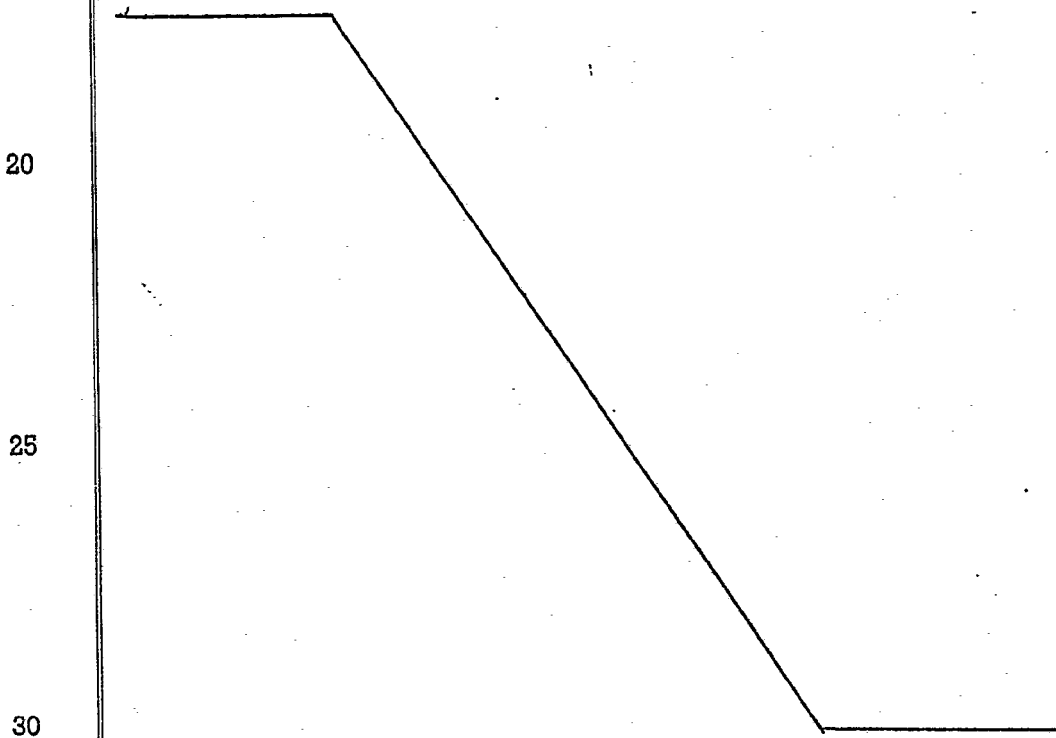


TABLA IV

Medidas del volúmen de la pata no inyectada del día 9 al día 18

<u>Tretamiento</u>	<u>Día 9</u>	<u>Día 11</u>	<u>Día 14</u>	<u>Día 16</u>	<u>Día 18</u>
(Control normal)	1,99 ± 0,063	2,13 ± 0,08	2,08 ± 0,053	2,15 ± 0,056	2,01 ± 0,95
Control TB	1,94 ± 0,028	2,02 ± 0,037	2,60 ± 0,106	3,26 ± 0,202	3,65 ± 0,227
Fonoprofen	1,97 ± 0,023	2,11 ± 0,07	2,38 ± 0,099	2,7 ± 0,107	2,67 ± 0,128 (23% de inhibición)*
2-(p-trifluorme tilfenil)-lh-pe rimidina	1,93 ± 0,081	1,95 ± 0,079	2,13 ± 0,148	2,53 ± 0,233	2,53 ± 0,39 (69% de inhibición)*

* Inhibición = 1 - $\frac{\text{Volúmen de medicamento tratado} - \text{Volúmen de control normal}}{\text{Volúmen de control TB} - \text{Volúmen de control normal}}$ X 100

TABLA IV

Medidas del volumen de la pata no inyectada del día 9 al día 18

<u>g</u>	<u>Día 11</u>	<u>Día 14</u>	<u>Día 16</u>	<u>Día 18</u>
0,063	2,13 ± 0,08	2,08 ± 0,053	2,15 ± 0,056	2,01 ± 0,95
0,028	2,02 ± 0,037	2,60 ± 0,106	3,26 ± 0,202	3,65 ± 0,227
0,023	2,11 ± 0,07	2,38 ± 0,099	2,7 ± 0,107	2,67 ± 0,128 (23% de inhibición)*
0,081	1,95 ± 0,079	2,13 ± 0,148	2,53 ± 0,233	2,53 ± 0,39 (69% de inhibición)*

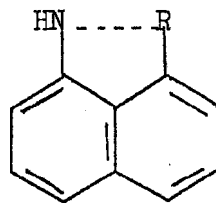
$$\frac{\text{Volúmen de medicamento tratado} - \text{Volúmen de control normal}}{\text{Volúmen de control TB} - \text{Volúmen de control normal}} \times 100$$

1 Una observación a groso modo de las fotos de rayos
X tomadas de las patas tanto inyectada como no inyectada, in-
dicó que no hubo daño en el hueso en los animales tratados
con clorhidrato de 2-(p-trifluorometilfenil)-1H-perimidina,
5 mientras que el daño del hueso fue muy obvio en el grupo de
control TB.

En resúmen, la Patente de invención que se solici-
ta, deberá recaer sobre las siguientes:

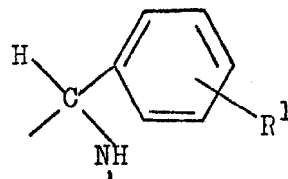
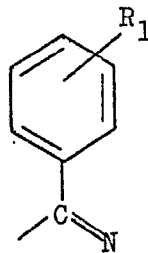
REIVINDICACIONES

10 1.- Un procedimiento para preparar nuevos compues-
tos de 2-aril-1H-perimidina de fórmula general

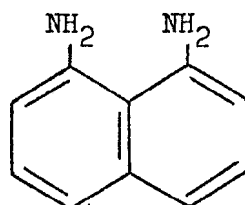


I

15 en donde: R es



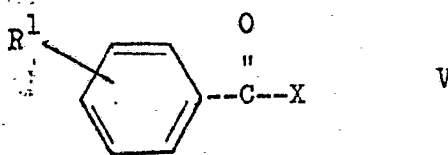
20 en donde R¹ es un grupo -CF₃, -OCF₃, -SCF₃, o -OC₂F₅ coloca-
do en meta o para; y sus sales farmacéuticamente aceptables,
25 que se caracteriza por condensar un 1,8-diaminonaftaleno de
fórmula



IV

30

1 con un compuesto acilo de fórmula V:



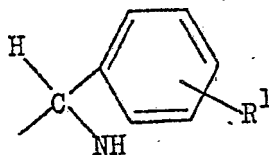
5 en. donde R¹ se define como antes y X es flúor, cloro, bromo o hidrógeno.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde R es



10 y X es flúor, cloro o bromo.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde R es



20 y X es hidrógeno.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 2, donde el compuesto de fórmula (V) es cloruro de p-trifluorometilbenzoílo.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 2, donde el compuesto de fórmula (V) es cloruro de m-trifluorometilbenzoílo.

6.- Un procedimiento según la reivindicación 2, donde el compuesto de fórmula (V) es fluoruro de p-trifluorometoxibenzoílo.

30 7.- Un procedimiento según la reivindicación 2,

1 donde el compuesto de fórmula (V) es cloruro de p-trifluor-
metiltiobenzóilo.

5 8.- Un procedimiento según la reivindicación 2,
donde el compuesto de fórmula (V) es cloruro de p-pentafluor-
retoxibenzóilo.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 3,
donde el compuesto de fórmula (V) es p-trifluormetilbenzal-
dehído.

10 10.- Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita
por: UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR NUEVOS COMPUESTOS DE
2-ARIL-1H-PERIMIDINA.

15 Todo confome queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva que consta de venticuatro
páginas mecanografiadas.

Madrid, 19 Diciembre de 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P.

20 

25

30