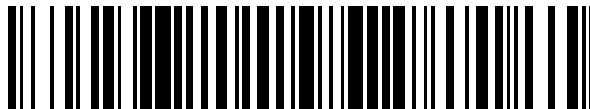


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 865**

21 Número de solicitud: 201331143

51 Int. Cl.:

A61K 31/5025 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.07.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.02.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070603

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
LA PAZ (55.0%)**

Paseo de la Castellana, 261

28046 Madrid ES y

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (45.0%)

72 Inventor/es:

SELGAS GUTIÉRREZ, Rafael;

BELLÓN HEREDIA, Teresa;

RODRÍGUEZ SANZ, Aranzazu Isabel;

VAQUERO LÓPEZ, Juan José;

ALAJARÍN FERRÁNDEZ, Ramón;

ÁLVAREZ-BUILLA GÓMEZ, Julio y

SÁNCHEZ ALONSO, Patricia

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE SALES DE PIRIDAZINO[1',6':1,2]PIRIDO[3,4-b]INDOLINIO COMO AGENTES ANTIINFLAMATORIOS**

57 Resumen:

Uso de compuestos derivados de sales de piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indolinio como agentes antiinflamatorios.

La presente invención está relacionada con compuestos de las familias de sales de piridazinopiridoindolinio, con las composiciones farmacéuticas que los contienen y con el uso de los mismos como agentes antiinflamatorios a través de la inhibición de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por monocitos y macrófagos proinflamatorios en mamíferos y en todas las enfermedades y condiciones en las que este mediador presenta niveles elevados, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, asma, bronquitis, enfermedad obstructiva de las vías respiratorias crónica, psoriasis, rinitis alérgica, espondilitis anquilosante, hidradenitis supurativa, dermatitis y cualquier otro estado inflamatorio que curse con niveles altos de TNF- α .

ES 2 529 865 A1

Uso de compuestos derivados de sales de piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indolinio
como agentes antiinflamatorios

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere al uso de compuestos inhibidores de la producción de TNF-alfa y por tanto útiles como agentes antiinflamatorios. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la biomedicina.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La inflamación es un proceso fisiológico complejo y dinámico que se produce en respuesta a un daño celular o tisular en un intento de defender al organismo frente a una agresión externa. No obstante, la inflamación crónica puede estar asociada a diversos procesos patológicos pudiendo ser el origen de los mismos o contribuir a un agravamiento del cuadro clínico.

Aunque diversos tipos celulares participan en los procesos inflamatorios, los macrófagos son los principales organizadores del proceso, contribuyendo en gran medida a la producción de diversas citoquinas proinflamatorias.

El TNF- α es una citoquina inflamatoria producida por macrófagos, células de linaje de macrófagos (células Kupffer), neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos, células NK, células LAK, células cebadas, células de la médula ósea, fibroblastos, astrocitos, queratinocitos y otros tipos celulares. Sin embargo, los macrófagos son los principales productores de TNF- α . Esta citoquina induce apoptosis en varias líneas tumorales y en combinación con otras citoquinas proinflamatorias es responsable de alteraciones en células endoteliales que originan diversas patologías que afectan a la microvasculatura. Además TNF- α promueve angiogénesis *in vivo*. En macrófagos estimula funciones microbicidas y la biosíntesis de otras citoquinas. Aunque TNF- α se requiere para una respuesta inmune normal, su sobre-expresión puede tener consecuencias patológicas. Es el principal mediador de caquexia en pacientes con tumores y es el principal responsable de algunos efectos graves durante sepsis por bacterias Gram negativas. Además se ha demostrado que desempeña un papel clave

en el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes y/o asociadas a inflamación crónica (artritis reumatoide, esclerosis múltiple).

La síntesis de TNF- α se induce por diferentes estímulos, incluido el IFN- γ ; pero el estímulo más potente en macrófagos es el LPS presente en la pared de las bacterias Gram negativas. Recientemente se ha descrito además que moléculas que se liberan por las células del organismo cuando sufren un daño o agresión son también capaces de inducir la producción de TNF- α .

Actualmente, los agentes antiinflamatorios esteroideos (hormonas) y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se utilizan para el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, estos agentes tienen diversos puntos de acción y no tienen una acción inhibitoria específica para TNF- α . Así, es probable que provoquen efectos secundarios perjudiciales, particularmente, los efectos secundarios de los antiinflamatorios esteroideos (corticoides) se han convertido en un problema médico.

Anti-TNF-alfa son los fármacos biológicos de más éxito hoy en día y están indicados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide crónica, artritis psoriásica, artritis idiopática autoinmune, psoriasis, espondilitis anquilosante, enfermedad Crohn y colitis ulcerosa, en las que han demostrado buenos resultados clínicos; pero tienen efectos secundarios como reacciones de hipersensibilidad, predisposición a infecciones que pueden ser graves como tuberculosis y sepsis, aumento del riesgo de desarrollo de tumores y el deterioro neuronal ocasionado por un efecto desmielinizante.

Durante los últimos años, varias estrategias encaminadas a inhibir selectivamente diversas citoquinas proinflamatorias han aportado terapias basadas en proteínas para enfermedades inflamatorias, validando la hipótesis terapéutica de que la intervención en la señalización a través de citoquinas puede aportar un beneficio terapéutico. Sin embargo, además de su elevadísimo coste estos productos proteicos presentan el inconveniente de su administración por vía intravenosa.

Por todo ello, se ha vuelto a prestar atención a nuevas estrategias encaminadas a desarrollar una nueva generación de inhibidores de TNF- α que permitan por ejemplo

su administración por vía oral y que presenten pocos efectos secundarios. Además de interferir con la producción o señalización de citoquinas proinflamatorias con fármacos activos de administración oral combinarían la comodidad de los fármacos convencionales con la eficacia probada de las terapias biológicas.

5

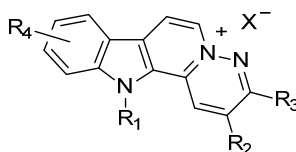
La preparación de sales de piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indolinio y piridazino[3,2-b]benzimidazolio se ha descrito anteriormente a través de una secuencia de dos reacciones a partir de azinas y azoles que presentan un grupo metilo en la posición α al átomo de nitrógeno. La primera reacción consiste en una N-aminación con un agente aminante como HOSA (ácido O-hidroxilaminosulfónico) o MSH (mesitilensulfonato de hidroxilamina). Esta sal de N-amino azinio o azolio se hace reaccionar posteriormente con una 1,2-dicetona en presencia de una base para dar una doble condensación que conduce a la sal final.

15 DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevos inhibidores de TNF- α , y por tanto, útiles para la prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias en mamíferos, preferiblemente en humanos.

20

Por tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I):



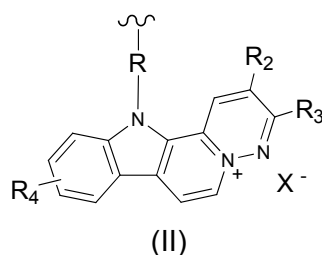
25

(I)

donde:

R_1 se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C_1 - C_{10}), alquenilo (C_2 - C_{10}), alquinilo (C_2 - C_{10}), $-(CH_2)_nCO_2R_1'$, $-(CH_2)_mR_1''$, $-(CH_2)_pCONHR_1'''$ o el grupo de fórmula (II):

30



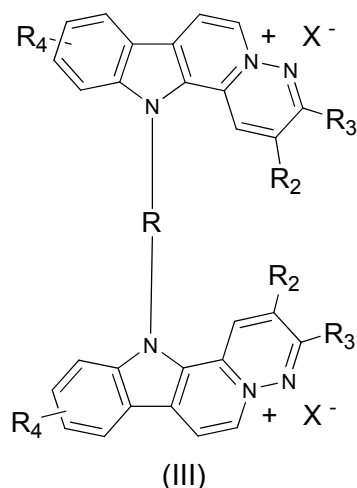
- donde R se selecciona de la lista que comprende alquilo (C₁-C₂₀), alquenilo (C₂-C₂₀),
 5 alquinilo (C₂-C₂₀), -(CH₂)_nCO₂R₁'-O₂C(CH₂)_n- ó -(CH₂)_pCONHR₁'''-NHOC(CH₂)_p-; n, m o
 p tienen un valor de entre 0 y 5 y R₁' se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C₁-
 C₁₀), R₁''' se selecciona de entre halógeno, alquenilo (C₂-C₄) o alquinilo (C₂-C₄) y R₁''''
 se selecciona de entre alquilo (C₁-C₄), alquenilo (C₂-C₄) o alquinilo (C₂-C₄);
 R₂ y R₃, son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo
 10 (C₃-C₆), arilo, heteroarilo o R₂ y R₃ pueden estar enlazados entre si formando parte de
 un anillo, saturado o aromático;
 R₄ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), halógeno, nitro,
 amino, hidroxilo, O-R₄', donde R₄' se selecciona entre un alquilo (C₁-C₁₂), arilo,
 aralquilo o heteroarilo; y
 15 X⁻ es un anión biológica o farmacéuticamente aceptable;
 o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptable, para la elaboración de un
 medicamento para la inhibición de la producción de TNF-α.

En una realización preferida, R₁ se selecciona de entre hidrógeno, -(CH₂)_nCO₂R₁' o
 20 -(CH₂)_mR₁'''.

En una realización más preferida, R₁' se selecciona de entre hidrógeno o alquilo (C₁-
 C₁₀) y n es 0 ó 1, más preferiblemente, R₁' es hidrógeno, metilo, etilo o *tert*-butilo.

25 En otra realización más preferida, R₁''' es un halógeno o un alquinilo (C₂-C₃) y m tiene
 un valor de 2 a 4, más preferiblemente R₁'''' es yodo o etinilo y m es 3.

Cuando R₁ es el grupo de fórmula (II), el compuesto de la invención es de fórmula
 general (III):



donde R, R₂, R₃, R₄ y X⁻ se han descrito anteriormente.

5

En una realización preferida, R es alquilo (C₅-C₁₅), alqueno (C₅-C₁₅) o alquino (C₅-C₁₅), más preferiblemente R es deca-4,6-diin-1,10-diilo.

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (III), R₂ y R₃, son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre metilo, etilo o 2-furilo o están enlazados entre si formando el 1,8-naftodiilo. Más preferiblemente, R₂ y R₃ son iguales.

10

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (III), R₄ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₃), halógeno, nitro, amino, O-R₄' , donde R₄' se selecciona entre un alquilo (C₁-C₃) o arilo, más preferiblemente R₄ se selecciona entre amino, bromo, nitro, metoxilo o benzoxilo.

15

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (III), X⁻ es haluro o mesitilensulfonato, más preferiblemente el haluro es bromuro, yoduro o cloruro.

20

El compuesto de fórmula general (I) o (III) se selecciona de la lista que comprende:
 mesitilensulfonato de 9-bromo-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio (Compuesto 4),
 mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-11-nitropiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio (Compuesto 7),

25

- dicloruro de 11-amonio-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 8),
 mesitilensulfonato de 10-benciloxi-12-*terc*-butoxicarbonil-2,3-dietilpiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 13),
 5 bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 17),
 mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 20),
 bromuro de 2,3-dietil-12-etoxicarbonilmetil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 22),
 10 yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23),
 bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24),
 15 mesitilensulfonato de 14-metoxi-16-(pent-4-inil)acenafto[1'',2'':3',4']piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-9-inio (Compuesto 27)
 mesitilensulfonato de 2,3-di-(2-furil)-10-metoxi-12-(pent-4-inil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 28) y
 dimesitilensulfonato de 12,12'-(deca-4,6-diin-1,10-diil)-bis-(2,3-dietil-10-
 20 metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio) (Compuesto 31).

En una realización más preferida el compuesto es bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 17).

25

Cualquiera de los compuestos descritos en la presente invención, de fórmula general (I) o (III), se pueden utilizar como agentes antiinflamatorios que cursan a través de la inhibición de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) o (III) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias, siendo estas enfermedades inflamatorias conocidas por un experto en la materia y más preferiblemente se pueden seleccionar de la lista que comprende artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática autoinmune, osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, uveitis, asma, bronquitis,

enfermedad obstructiva de las vías respiratorias crónica, psoriasis, rinitis alérgica, espondilitis anquilosante, hidradenitis supurativa, dermatitis y cualquier otro estado inflamatorio con niveles altos de producción de TNF- α , incluyendo todo estado inflamatorio que suceda asociado a una enfermedad renal.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos seleccionados de la lista que comprende:

yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23) y

10 bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto seleccionado de entre yoduro de 2,3-dietil-10-
15 metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23) y bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24), , además de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Opcionalmente esta composición farmacéutica también comprende otro principio activo, preferiblemente se puede seleccionar de entre un agente antiinflamatorio o un
20 inhibidor de la producción de TNF- α .

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por un experto en la materia.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto seleccionado de entre yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23) y bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24), para la elaboración de un medicamento.

30

Las composiciones farmacéuticas o medicamentos descritos en la presente invención se pueden administrar mediante cualquier preparación farmacéutica apropiada y conocida por cualquier experto en la materia, como ejemplos de preparaciones farmacéuticas se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras,

cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (geles, soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, nasal, tópica o parenteral. Preferiblemente la administración será vía oral o parenteral (inyectable).

- 5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para inhibición de la producción de TNF- α o para el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias, más particularmente de las descritas anteriormente, en un mamífero, preferiblemente un humano, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de fórmula (I) o (III).
- 10 Preferiblemente, la administración de la composición se puede realizar por vía oral, o parenteral (inyectable).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características

15 propias de la composición, la edad, estado y antecedentes del paciente, la severidad de la enfermedad, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, de fórmula (I) o (III), se forman

20 como sales biológica y farmacéuticamente aceptables. Las formas de sales útiles son los haluros, particularmente el yoduro, bromuro y el cloruro, tosilatos, metanosulfonatos, brosilatos, fumaratos, maleatos, succinatos, acetatos, sales de mesitilensulfonato, y similares. Otras sales relacionadas se pueden formar utilizando de forma similar aniones no tóxicos que son biológica y farmacéuticamente

25 aceptables.

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo. Preferiblemente el grupo

30 alquilo tiene entre 1 y 10, y más preferiblemente entre 1 y 4, átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico arilo, hidroxilo, amino, amido, éster, éter, tiol, acilamino o carboxamido, que a su vez pueden opcionalmente estar sustituidos. Preferiblemente el grupo alquilo no está sustituido.

35

El término “alquenilo” se refiere en la presente invención a un radical alquilo, tal y como se ha definido anteriormente, y que tiene en su cadena al menos un doble enlace carbono-carbono.

- 5 El término “alquinilo” se refiere en la presente invención a un radical alquilo, tal y como se ha definido anteriormente, y que tiene en su cadena al menos un triple enlace carbono-carbono.

10 El término “cicloalquilo” se refiere, en la presente invención, a un radical de cadena carbocíclica saturada y que consiste en átomos de carbono, entre 3 y 6, más preferiblemente 5 o 6. Puede estar opcionalmente sustituido con 1 o más sustituyentes del grupo formado por alquilo, hidroxilo, nitro, amino, halógeno, arilo o aralquilo.

15 El término “arilo” se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 5 a 18 átomos de carbono, pudiendo ser de anillo único ó múltiple, en este último caso con anillos separados y/o condensados. Un ejemplo, no limitante, de arilo es un grupo fenilo, naftilo, indenilo, furilo etc....El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido por al menos un grupo seleccionado de entre un hidroxilo, éster, carboxilo, alquilo o halógeno.

20

El término “aralquilo” se refiere, en la presente invención, a una cadena alifática de entre 1 y 5 átomos de carbono en la que al menos uno de los hidrógenos se ha sustituido por un grupo arilo, con las acepciones anteriores, como por ejemplo, pero sin limitarse, un grupo bencilo o fenetilo. Estos grupos aralquilo pueden, a su vez, 25 estar opcionalmente sustituidos por un grupo alquilo, hidroxilo, nitro, amino o halógeno. Preferiblemente es un grupo bencilo, opcionalmente sustituido, y más preferiblemente es un grupo bencilo que no está sustituido.

30 El término “heteroarilo” se refiere, en la presente invención, a un radical de cadena carbocíclica (mono- o bicíclicos) y que consiste en átomos de carbono, entre 3 y 6, más preferiblemente 5 o 6, donde al menos un átomo de carbono es sustituido por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno o azufre. Esta cadena carbocíclica puede estar insaturada o parcialmente saturada. Puede estar opcionalmente sustituida por 1 o más sustituyentes del grupo formado por alquilo, 35 hidroxilo, nitro, amino, halógeno, arilo o aralquilo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 Fig. 1. Viabilidad celular de la línea promonocítica humana THP-1 preincubada durante 24 horas con concentraciones crecientes de algunos compuestos de las Fórmulas (I) y (III) en presencia o ausencia de 100 ng/ml de LPS.

15 Fig. 2. Efecto de algunos compuestos de Fórmulas (I) y (III) en la producción de TNF- α inducida por LPS (100 ng/ml) en la línea celular promonocítica humana THP-1.

Fig. 3. Efecto del compuesto **17** sobre la producción de TNF- α inducida por LPS (10 ng/ml) en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas.

20 Fig. 4. Efecto del compuesto **17** sobre la producción de TNF- α inducida por LPS (10 ng/ml) en monocitos humanos aislados de sangre periférica.

Fig. 5. Inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS (100 ng/ml) en células THP-1 por el compuesto **17** y cálculo de la IC₅₀ (4,49 μ M) en células THP-1.

25

Fig. 6. Inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS (10 ng/ml) en PBMCs humanos por el compuesto **17** y cálculo de la IC₅₀ (3,91 μ M) en PBMCs.

Fig. 7. Inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS (10 ng/ml) en monocitos (leucocitos CD14+) humanos por el compuesto **17** y cálculo de la IC₅₀ (3,22 μ M) en monocitos aislados.

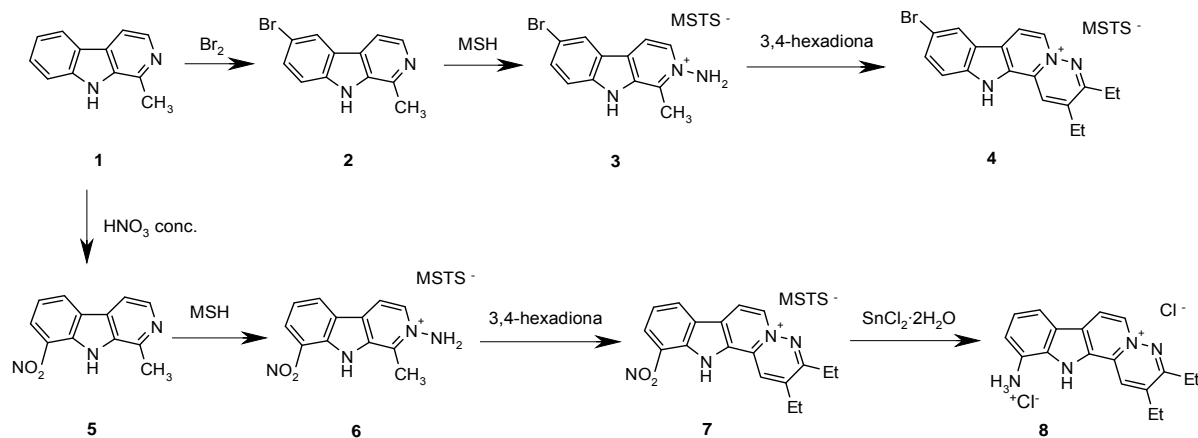
30 Fig. 8. Análisis del efecto de la administración "in vivo" del compuesto **17**.

EJEMPLOS

Los compuestos de esta invención que han sido publicados, se han preparado según los procedimientos descritos anteriormente para ellos (Fontana, A.; Benito, E. J.; Martín, M. J.; Sánchez, N.; Alajarín, R.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J.; Lambel-Giraudet, S.; Leonce, S.; Pierré, A.; Caignard, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *11*, 2611-2614; Pastor, J.; Siro, J. G.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J. J.; Rodrigo, M. M.; Ballesteros, M.; Álvarez-Builla, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 3043-3048; Siro, J. G.; Pastor, J.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J.; Gago, F.; de Pascual-Teresa, B.; Pastor, M.; Rodrigo, M. M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5476-5483; Siro, J. G.; Pastor, J.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 19229-1936; Enrique J. Benito Molinero, Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá, 2004). Para otros compuestos, se han aplicado procedimientos similares a los descritos en esta invención.

15

Esquema 1. Proceso de síntesis de los compuestos 2 a 8.



20 **Ejemplo 1. Preparación de 6-bromo-1-metilpirido[3,4-b]indol (Compuesto 2, Esquema 1)**

A una disolución de harmano **1** (0,20 g; 1,1 mmol) en THF (tetrahidrofurano) (10 mL), se añade bromo (0,70 g; 4,4 mmol) con agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se adiciona una alícuota de tiosulfato sódico (10 %; 25 10 mL), se basifica la mezcla con hidróxido amónico concentrado, se extrae y se lava con diclorometano (3 x 10 mL). La fase orgánica se concentra, purificándose el residuo

obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente una mezcla diclorometano:metanol (10:1). Se aísla el producto como un sólido verde (0,19 g; 66%).

P. f. = 224-226 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 8,19 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz); 8,15 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz); 7,68 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz); 7,55 (dd, 1H, *J* = 8,7 Hz, *J* = 1,9 Hz); 7,37 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz); 2,74 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CDCl₃): δ 142,1; 139,2; 137,0; 135,0; 130,7; 127,0; 124,1; 123,0; 113,1; 112,8; 112,0; 19,2 ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3141; 3051; 2954; 2865; 1621; 1569; 1492; 1439; 1406; 1272; 1247; 977; 821; 800; 607 cm⁻¹.

10 **Ejemplo 2. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-6-bromo-1-metil-pirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 3, Esquema 1)**

Sobre una disolución de **2** (0,26 g; 1 mmol) en diclorometano (10 mL), con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de O-mesitilensulfonato de hidroxilamina (MSH) (0,30 g; 1,4 mmol) en diclorometano (5 mL).

15 Al cabo de 1 hora, se añade éter dietílico para facilitar la precipitación de la sal formada. Se filtra y se lava sucesivamente con diclorometano (2 x 5 mL) y acetona (2 x 5 mL), recristalizándose posteriormente en etanol. Se obtiene el producto como un sólido amarillo (0,38 g; 80%).

P. f. = 253-255 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 12,91 (s, 1H, NH); 8,71 (d, 1H, *J* = 1,8 Hz); 8,54 (s, 2H, NH); 7,89-7,81 (m, 3H); 7,70 (dd, 1H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 3,0 Hz); 6,70 (s, 2H); 2,98 (s, 3H); 2,46 (s, 6H); 2,13 (s, 3H) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3258; 3151; 3082; 1638; 1484; 1451; 1281; 1166; 1088; 1016; 808; 681 cm⁻¹.

25 **Ejemplo 3. Preparación de mesitilensulfonato de 8-bromo-2,3-dietil-11H-piridazino[1',6':1,2] pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 4, Esquema 1)**

A una disolución de **3** (0,24 g; 0,5 mmol) en etanol (20 mL), se añade 3,4-hexadiona (0,07 g; 0,6 mmol) y TEA (trietilamina) (0,06 g; 0,6 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 horas y se concentra a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna en gel de sílice empleando como eluyente diclorometano:metanol (10:1). Se obtiene un sólido amarillo (0,17 g; 62%).

30 P. f. = 216-218 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 13,67 (s, 1H, NH); 9,27 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz); 8,99 (s, 1H); 8,90 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 8,83 (s, 1H); 7,87 (s_{ap}, 2H); 6,70 (s, 2H); 3,17 (c, 2H, *J* = 7,4 Hz); 3,01 (c, 2H, *J* = 7,0 Hz); 2,46 (s, 6H); 2,13 (s, 3H); 1,44 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz); 1,40 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CDCl₃ + CD₃OD): δ 163,7;

154,0; 143,4; 142,4; 140,5; 136,4; 135,9; 132,5; 130,7; 130,6; 129,9; 128,9; 125,0;
 124,3; 121,6; 117,3; 115,0; 114,0; 25,9; 23,9; 22,7; 20,3; 11,2; 10,4 ppm. IR (ν_{\max} ,
 KBr): 3412; 2968; 2932; 1638; 1566; 1521; 1450; 1324; 1283; 1226; 1160; 1084; 1008;
 675 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3\text{SBr}\cdot\text{H}_2\text{O}$; C: 56,45; H: 5,61;
 5 N: 7,32; encontrado: C: 56,12; H: 5,47; N: 7,87.

Ejemplo 4. Preparación de 1-metil-8-nitropirido[3,4-b]indol (Compuesto 5, Esquema 1)

Sobre ácido nítrico concentrado 60% (12 mL) se adiciona harmano **1** (0,91 g; 5 mmol)
 10 manteniendo la temperatura a 0 °C, y agitación vigorosa durante 2 horas, tras las
 cuales, se aumenta la temperatura hasta disolver la suspensión blanca, manteniendo
 la agitación 30 minutos más. Se añade agua/hielo a la suspensión y se basifica con
 carbonato potásico, filtrando el precipitado sólido obtenido. Tras cromatografiar en
 columna de sílica gel empleando como eluyente una mezcla diclorometano:metanol
 15 (20:1), se aísla el compuesto como un sólido amarillo (0,37 g; 33%).

P. f. = 215-217 °C. ^1H -RMN (300 MHz; CDCl_3): δ 9,93 (s, 1H, NH); 8,47-8,42 (m, 3H);
 7,82 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz); 7,37 (t_{ap} , 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,7$ Hz); 2,89 (s, 3H) ppm. ^{13}C -
 RMN (75 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 142,9; 139,5; 134,4; 133,4; 132,6; 129,1; 127,4;
 125,6; 124,3; 119,3; 112,8; 19,7 ppm. IR (ν_{\max} , KBr): 3378; 3091; 1635; 1574; 1475;
 20 1430; 1340; 1305; 1266; 1205; 1180; 803; 737 cm^{-1} .

Ejemplo 5. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-1-metil-8-nitropirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 6, Esquema 1)

Sobre una disolución de **5** (0,22 g; 1 mmol) en diclorometano (10 mL), con agitación
 25 vigorosa a temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de MSH (0,30
 g; 1,4 mmol) en diclorometano (5 mL). Al cabo de 1 hora, se añade éter dietílico para
 facilitar la precipitación total de la sal aminada formada. Se filtra y se lava
 sucesivamente con diclorometano (2 x 5 mL) y acetona (2 x 5 mL), recristalizándose
 posteriormente en etanol. Se obtiene un sólido amarillo (0,36 g; 82%).

30 P. f. = 289-291 °C. ^1H -RMN (300 MHz; CD_3OD): δ 8,80 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 8,70 (d, 1H,
 $J = 7,9$ Hz); 8,63-8,54 (m, 2H); 7,64 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz); 6,80 (s, 2H); 3,24 (s, 3H); 2,57
 (s, 6H); 2,19 (s, 3H) ppm. IR (ν_{\max} , KBr): 3229; 3090; 1689; 1624; 1523; 1486; 1390;
 1310; 1289; 1181; 1086; 1015; 845; 748; 680 cm^{-1} .

Ejemplo 6. Preparación de mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-11-nitropiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio (Compuesto 7, Esquema 1)

A una disolución de **6** (0,22 g; 0,5 mmol) en etanol (20 mL), se añade 3,4-hexadiona (0,07 g; 0,6 mmol) y TEA (0,06 g; 0,6 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 horas, se concentra a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente una mezcla diclorometano:metanol (10:1). Se obtiene un sólido amarillo (0,10 g; 40%).

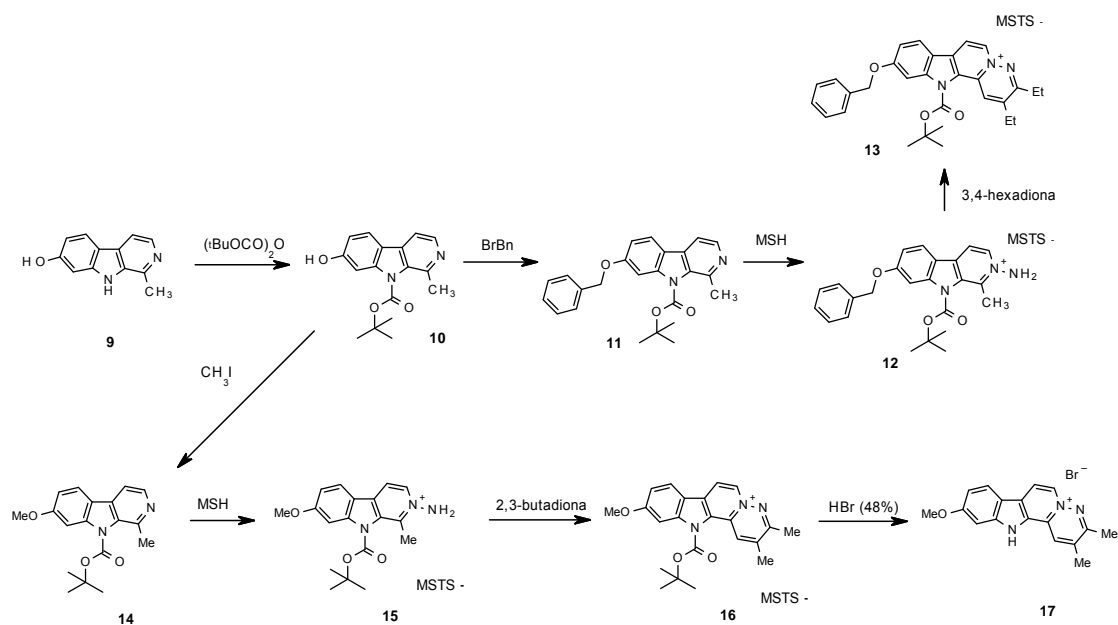
P. f. = 198-200 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CD₃OD): δ 9,60 (s, 1H); 9,13 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz); 8,84-8,78 (m, 2H); 8,68 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz); 7,63 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz); 6,86 (s, 2H); 3,22 (c, 2H, *J* = 7,0 Hz); 3,08 (c, 2H, *J* = 7,0 Hz); 2,58 (s, 6H); 2,20 (s, 3H); 1,60 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz); 1,52 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CD₃OD): δ 164,7; 155,6; 144,7; 136,9; 136,6; 134,5; 132,8; 132,6; 132,0; 131,5; 130,6; 127,2; 126,6; 125,3; 122,0; 118,8; 118,2; 108,7; 26,9; 25,1; 23,7; 21,1; 13,1; 11,7 ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3126; 2976; 2938; 1687; 1617; 1566; 1468; 1425; 1317; 1252; 1206; 1177; 1104; 801; 738 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₂₇H₂₈N₄O₅S·2H₂O; C: 58,26; H: 5,80; N: 10,07; encontrado: C: 57,73; H: 5,72; N: 10,40.

Ejemplo 7. Preparación de dicloruro de 11-amonio-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio (Compuesto 8, Esquema 1)

Una suspensión de **7** (0,10 g; 0,2 mmol), SnCl₂·2H₂O (0,2 g; 0,8 mmol) y HCl (35%, 0,5 mL) en agua (2 mL), se calienta a reflujo durante 2 horas, tras lo cual, se añade a la mezcla HCl (35%, 0,2 mL). El precipitado obtenido se filtra y se lava sucesivamente con HCl (10%, 1 mL) y éter dietílico (2 x 10 mL). Se obtiene el producto como un sólido amarillo (0,05 g; 71%).

P. f. = 266-268 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 9,24 (s, 1H); 9,05 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 8,70 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 7,70 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz); 7,21 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz); 6,98 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz); 4,25 (s_{ap}, 3H, NH); 3,11 (c, 2H, *J* = 7,4 Hz); 2,95 (c, 2H, *J* = 7,0 Hz); 1,46 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz); 1,38 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3420; 1627; 1554; 1483; 1414; 1338; 1253; 1238; 1210; 1011; 821; 749 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₁₈H₁₉N₄Cl₂·3H₂O; C: 51,58; H: 6,28; N: 13,43; encontrado: C: 52,16; H: 6,08; N: 12,78.

Esquema 2.- Proceso de síntesis de los compuestos 10 a 17.



Ejemplo 8. Preparación de 9-N-Boc-harmol (Compuesto 10, Esquema 2)

Sobre una disolución de harmol **9** (1 g; 5 mmol) en diclorometano (50 mL), se adiciona
 5 sucesivamente carbonato de di-terbutilo (2,18 g; 10 mmol), TEA (0,50 g; 5 mmol) y
 DMAP (4-dimetilaminopiridina) (0,61 g; 5 mmol). Tras dejar la mezcla con agitación a
 temperatura ambiente durante 24 horas, se elimina el disolvente a vacío, sin llegar a
 sequedad (20 mL), lavando la mezcla con agua (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca
 con MgSO₄ anhidro, se concentra a sequedad, purificando el residuo obtenido por
 10 cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente
 diclorometano:metanol (20:1). Se aísla el compuesto como un sólido blanco (1,14 g;
 77 %).

P. f. = 167-169 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 9,16 (s, 1H); 8,29 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz);
 7,70 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz); 7,51 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz); 7,18 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz); 6,97 (dd, 1H,
 15 *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,0 Hz); 2,73 (s, 3H); 1,63 (s, 9H) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CDCl₃): δ
 153,0; 150,7; 141,7; 140,8; 138,0; 135,4; 127,3; 122,0; 119,4; 113,3; 112,6; 104,5;
 84,7; 27,6; 20,4 ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3135; 3066; 2982; 2884; 1755; 1637; 1571; 1450;
 1373; 1323; 1282; 1251; 1233; 1146; 949; 897; 749 cm⁻¹. Análisis Elemental para
 C₁₇H₁₈N₂O₃; C: 68,43; H: 6,08; N: 9,39; encontrado C: 67,99; H: 6,11; N: 8,92.

20

Ejemplo 9. Preparación de 7-benciloxi-9-*terc*-butoxicarbonil-1-metilpirido[3,4-*b*]indol (Compuesto 11, Esquema 2)

A una suspensión de **10** (0,30 g; 1 mmol), hidróxido potásico pulverizado (0,07 g; 1,2 mmol), carbonato potásico anhidro (0,17 g; 1,2 mmol) y dicloruro de bis(*N,N'*-bencil-*N,N'*-dietil)-*N,N'*-(oxidi-2,1-etanodiil)diamonio (BBDE-Cl) (0,02 g; 0,05 mmol) en acetonitrilo seco (50 mL) con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se adiciona
 5 bromuro de bencilo (BrBn)(0,20 g; 1,2 mmol). La suspensión resultante se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se filtra la suspensión y se lavan las sales con acetonitrilo. Las aguas de filtrado y lavado se concentran a sequedad, eliminando el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como
 10 eluyente diclorometano:metanol (10:1). El producto se obtiene como un sólido amarillo pálido (0,30 g; 77 %).

P. f. = 180-182 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 8,33 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz); 8,10 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 7,82 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz); 7,29-7,22 (m, 3H); 7,16 (d, 1H, *J* = 1,8 Hz); 7,11 (dd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz); 6,99-6,95 (m, 2H); 5,73 (s, 2H); 2,84 (s, 3H); 1,60 (s,
 15 9H) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CDCl₃): δ 151,7; 151,5; 142,2; 141,5; 138,6; 137,5; 136,0; 128,9; 128,7; 127,4; 125,2; 122,0; 118,9; 114,1; 112,7; 102,2; 83,5; 48,2; 27,6; 23,0 ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3416; 2981; 1752; 1625; 1442; 1407; 1371; 1320; 1284; 1248; 1154; 1136; 817; 721; 649 cm⁻¹. Análisis Elemental para C₂₄H₂₄N₂O₃: C: 74,21; H: 6,23; N: 7,21; encontrado C: 73,85; H: 6,17; N: 7,44.

20

Ejemplo 10. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-7-benciloxi-9-terc-butoxicarbonil-1-metilpirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 12, Esquema 2)

Sobre una disolución de **11** (0,38 g; 1 mmol) en éter dietílico (10 mL) con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de MSH (0,30
 25 g; 1,4 mmol) en diclorometano (5 mL). Al cabo de una hora, se añade éter dietílico para facilitar la precipitación total de la sal aminada formada. Se filtra y se lava sucesivamente con diclorometano (2 x 5 mL) y éter dietílico (2 x 5 mL), obteniéndose el producto como un sólido de color blanco (0,50 g; 84%).

P. f. = 166-168 °C (desc.). ¹H-RMN (300 MHz; CD₃OD): δ 8,53 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz); 8,44
 30 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz); 8,41 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 7,54 (d, 1H, *J* = 1,5 Hz); 7,33-7,28 (m, 4H); 7,02 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz); 6,79 (s, 2H); 5,92 (s, 2H); 3,03 (s, 3H); 2,57 (s, 6H); 2,18 (s, 3H); 1,52 (s, 9H) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3420; 3285; 3157; 3064; 2978; 1758; 1630; 1449; 1370; 1324; 1276; 1251; 1209; 1180; 1156; 1135; 1085; 1015; 849; 678 cm⁻¹.

Ejemplo 11. Preparación de mesitilensulfonato de 10-benciloxi-12-*terc*-butoxicarbonil-2,3-dietilpiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio (Compuesto 13, Esquema 2)

A una disolución de **12** (0,30 g; 0,5 mmol) en etanol (20 mL) se añade 3,4-hexadiona
 5 (0,07 g; 0,6 mmol) y acetato sódico anhidro (0,05 g; 0,6 mmol). Tras 30 minutos a
 reflujo, se adiciona nuevamente a la mezcla 3,4-hexadiona (0,5 mmol) y acetato sódico
 anhidro (0,04 g; 0,5 mmol), dejando finalmente la mezcla a reflujo durante 2 horas, tras
 las cuales se concentra a sequedad y el residuo se purifica por cromatografía en
 columna de gel de sílice empleando como eluyente diclorometano:metanol (10:1). Se
 10 obtiene un sólido amarillo (0,23 g; 63%).

P. f. = 183-185 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CD₃OD + CDCl₃): δ 8,82 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz);
 8,69 (s, 1H); 8,67 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz); 8,35 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz); 7,51 (s, 1H); 7,26-7,13
 (m, 6H); 6,57 (s, 2H); 6,42 (s, 2H); 2,97 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 2,84 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz);
 2,47 (s, 6H); 2,11 (s, 3H); 1,59 (s, 9H); 1,40 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz); 1,09 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz)
 15 ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CD₃OD + CDCl₃): δ 163,1; 153,6; 151,1; 145,2; 142,7; 139,2;
 138,2; 136,6; 134,6; 131,6; 130,2; 130,0; 129,4; 127,6; 125,2; 125,1; 123,3; 123,2;
 117,6; 117,1; 116,1; 112,7; 103,3; 84,2; 49,1; 27,4; 26,1; 24,2; 22,4; 20,4; 11,0; 10,2
 ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3408; 2978; 2934; 1758; 1622; 1574; 1451; 1411; 1337; 1139;
 1086; 1014; 809; 678 cm⁻¹. Análisis Elemental para C₃₉H₄₃N₃O₆S·3H₂O; C: 63,65; H:
 20 6,71; N: 5,71; encontrado C: 63,76; H: 6,47; N: 5,84.

Ejemplo 12. Preparación de 9-*terc*-butoxicarbonil-1-metil-7-metoxipirido[3,4-*b*]indol (Compuesto 14, Esquema 2)

A una suspensión de **10** (0,30 g; 1 mmol), hidróxido potásico pulverizado (0,07 g; 1,2
 25 mmol), carbonato potásico anhidro (0,17 g; 1,2 mmol) y BBDE-Cl (0,02 g; 0,05 mmol)
 en acetonitrilo seco (50 mL) con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se
 adiciona yodometano (0,17 g; 1,2 mmol). La suspensión resultante se agita
 vigorosamente a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se filtra la
 suspensión y se lavan las sales con acetonitrilo. Las aguas de filtrado y lavado se
 30 concentran a sequedad, eliminando el disolvente a presión reducida. El residuo
 obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como
 eluyente diclorometano:metanol (10:1). El producto se obtiene como un sólido amarillo
 pálido (0,20 g; 65%).

P. f. = 133-135 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; CDCl_3): δ 8,23 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); 7,98 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz); 7,70 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); 7,19 (s, 1H); 7,00 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz); 4,06 (s, 3H); 2,95 (s, 3H); 1,64 (s, 9H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3412; 2979; 2929; 1755; 1624; 1450; 1408; 1370; 1248; 1148; 1136; 819 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ C: 69,22; H: 6,45; N: 8,97; encontrado C: 68,93; H: 6,37; N: 9,12.

Ejemplo 13. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-9-*terc*-butoxicarbonil-1-metil-7-metoxipirido[3,4-*b*]indol-2-inio (Compuesto 15, Esquema 2)

Sobre una disolución de **14** (0,30 g; 1 mmol) en éter dietílico (10 mL) con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de MSH (0,30 g; 1,4 mmol) en diclorometano (5 mL). Al cabo de una hora, se añade éter dietílico para facilitar la precipitación total de la sal aminada formada. Se filtra y se lava sucesivamente con diclorometano (2 x 5 mL) y éter dietílico (2 x 5 mL), obteniéndose el producto como un sólido de color blanco (0,46 g; 88%).

P. f. = 157-159 °C (desc.). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,78 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz); 8,49 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz); 8,34 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 7,94 (s, 2H, NH); 7,60 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz); 7,23 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,2$ Hz); 6,71 (s, 2H); 3,94 (s, 3H); 2,82 (s, 3H); 2,47 (s, 6H); 2,14 (s, 3H); 1,69 (s, 9H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3418; 2983; 1747; 1619; 1457; 1356; 1261; 1209; 1144; 1097; 835; 685 cm^{-1} .

Ejemplo 14. Preparación de mesitilensulfonato de 12-*terc*-butoxicarbonil-2,3-dimetil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio (Compuesto 16, Esquema 2)

A una disolución **15** (0,27 g; 0,5 mmol) en etanol (20 mL), se añade 2,3-butanodiona (0,05 g; 0,6 mmol) y acetato sódico anhidro (0,05 g; 0,6 mmol). Tras 30 minutos a reflujo, se adiciona nuevamente a la mezcla 2,3-butanodiona (0,5 mmol) y acetato sódico anhidro (0,04 g; 0,5 mmol), dejando finalmente la mezcla 2 horas a reflujo, tras las cuales se concentra a sequedad la mezcla, purificando el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente diclorometano:metanol (10:1). El producto se obtiene como un sólido amarillo (0,11 g; 40%).

P. f. = 160-162 °C (desc.). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 9,10 (s, 1H); 8,80 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,57 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,29 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 7,48 (s, 1H); 7,17 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz); 6,75 (s, 2H); 3,96 (s, 3H); 2,74 (s, 3H); 2,69 (s, 3H); 2,52 (s, 6H);

2,15 (s, 3H); 1,58 (s, 9H) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 161,6; 153,4; 149,8; 144,8; 141,2; 137,4; 135,3; 131,2; 130,2; 129,7; 129,5; 128,2; 127,1; 125,9; 123,8; 117,2; 116,8; 112,7; 103,1; 84,7; 55,5; 27,2; 23,0; 20,6; 19,9; 19,7; 19,3; 18,4 ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3408; 2979; 2927; 1758; 1624; 1556; 1458; 1370; 1311; 1252; 1184; 1124; 1012; 849; 670 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{SO}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ C: 62,49; H: 6,26; N: 7,05; encontrado C: 62,37; H: 6,11; N: 7,11.

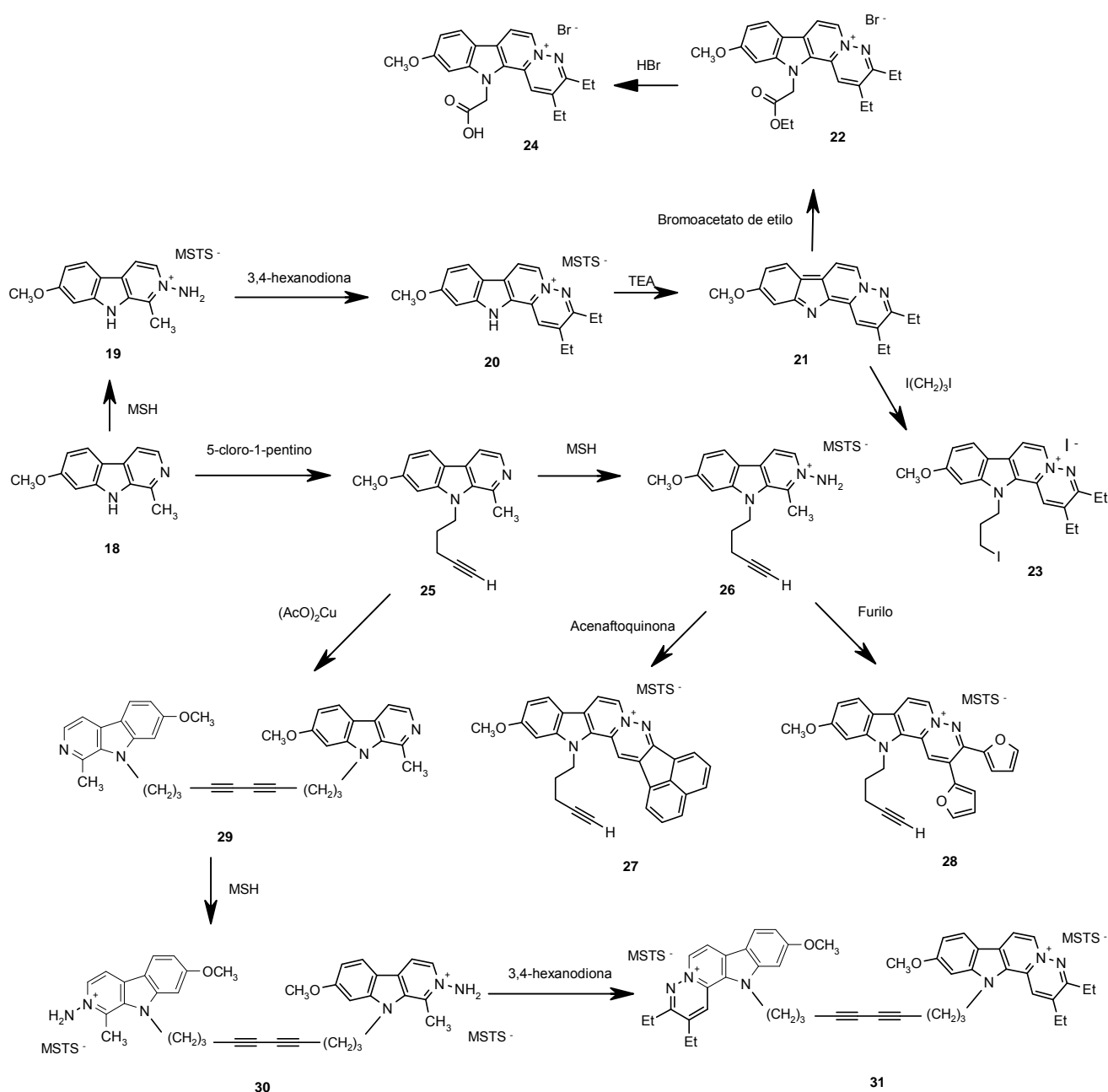
Ejemplo 15. Preparación de bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio (Compuesto 17, Esquema 2)

Una suspensión formada por **16** (0,11 g; 0,2 mmol) y ácido bromhídrico concentrado (1 mL) en acetona (10 mL) se lleva a reflujo durante 2 horas. Al cabo de dicho tiempo, la suspensión resultante se filtra en caliente, lavando el sólido obtenido con acetona (2 x 10 mL). El producto se obtiene como un sólido anaranjado (0,065 g; 91%).

P. f. = 204-206 °C. ^1H -RMN (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 13,33 (s, 1H); 9,18 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,92 (s, 1H); 8,77 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,39 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 7,24 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz); 7,11 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,2$ Hz); 3,95 (s, 3H); 2,75 (s, 3H); 2,62 (s, 3H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3419; 2984; 1627; 1482; 1445; 1410; 1332; 1274; 1200; 1165; 1094; 1023; 812; 682 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{OBr} \cdot \text{H}_2\text{O}$ C: 54,26; H: 4,82; N: 11,17; encontrado C: 54,38; H: 5,03; N: 10,94.

20

Esquema 3.- proceso de síntesis de los compuestos 19 a 31.



Ejemplo 16. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-1-metil-7-metoxi-9H-pirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 19, Esquema 3)

- 5 A una disolución de harmina comercial 18 (0,20 g; 0,94 mmol) en diclorometano (5 mL), con agitación y a temperatura ambiente, se adiciona gota a gota, otra disolución de O-mesitilensulfonato de hidroxilamina (MSH) (0,41 g; 1,32 mmol) en diclorometano (2 mL). La mezcla se deja con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, tras lo cual se añade éter etílico a la suspensión resultante. El sólido obtenido se filtra y se

lava sucesivamente con diclorometano y acetona. Se obtiene un sólido blanco (0,37 g; 92%).

P. f. = 234-235 °C (*Lit.* 235-237 °C).

5 **Ejemplo 17. Preparación de mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12H-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 20, Esquema 3)**

Sobre una suspensión de **19** (0,15 g; 0,35 mmol) en etanol (5 mL), se añade 3,4-hexanodiona (0,04 g; 0,35 mmol) y acetato sódico anhidro (0,03 g; 0,35 mmol). Tras 24 horas a reflujo, y posterior triturado del aceite con un mezcla de acetona-éter etílico, se
10 filtra el sólido así obtenido, lavándose éste posteriormente con acetona en caliente. Se recrystaliza en ácido acético-acetona y se obtiene un sólido amarillo pálido (0,10 g; 56%).

P. f. = 253-254 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 12,87 (s, 1H); 9,12 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 8,91 (s, 1H); 8,72 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 8,34 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 7,22 (d, 1H, *J* = 2,0
15 Hz); 7,07 (dd, 1H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 1,8 Hz); 3,93 (s, 3H); 3,10 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 2,95 (c, 2H, *J* = 7, 3 Hz); 1,42 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz); 1,37 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz) ppm. IR (*v*_{max}, KBr): 2979; 2940; 1630; 1569; 1460; 1412; 1336; 1225; 1167; 1087; 1016; 813; 678 cm⁻¹.
Análisis elemental: Calculado para C₂₈H₃₁N₃O₄S·1/2H₂O; C: 65,35; H: 6,27; N: 8,16; encontrado: C: 65,07; H: 6,44; N: 7,90.

20

Ejemplo 18. Preparación de 2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol (Compuesto 21, Esquema 3)

Una suspensión de **20** (0,10 g; 0,2 mmol) en agua (5 mL) se trató con trietilamina en exceso a temperatura ambiente. Inmediatamente, la suspensión cambió a una
25 coloración más oscura e intensa. Tras 1 hora con agitación a temperatura ambiente, el sólido en suspensión se filtra, se lava con agua, hasta que las aguas dejan de ser básicas, y se seca a vacío, obteniéndose la anhidrobase como un sólido rojo-anaranjado (0,055 g; 90%).

P. f. = 191-193 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 9,12 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz); 8,91 (s, 1H); 8,72 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz); 8,34 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz); 7,22 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz); 7,07
30 (dd, 1H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,4 Hz); 3,93 (s, 3H); 3,10 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 2,95 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 1,42 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz); 1,37 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz) ppm. IR (*v*_{max}, KBr): 2971; 2935; 1618; 1565; 1462; 1410; 1319; 1201; 1159; 1124; 1085; 1030; 771 cm⁻¹. Análisis

elemental: Calculado para C₁₉H₁₉N₃O; C: 74,73; H: 6,27; N: 13,26; encontrado: C: 74,40; H: 6,49; N: 13,01.

Ejemplo 19. Preparación de bromuro de 2,3-dietil-12-etoxicarbonilmetil-10-metoxi piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 22, Esquema 3)

A una suspensión de **21** (0,06 g; 0,2 mmol) en acetonitrilo (5 mL), agitada a temperatura ambiente, se añade gota a gota bromoacetato de etilo (0,17 g; 1 mmol). Transcurridas 24 horas, la suspensión resultante se filtra, obteniendo un sólido, que se lava sucesivamente con acetona (2 x 1 mL) y la mínima cantidad de etanol. Finalmente se recristaliza en una mezcla etanol-éter etílico, y se obtiene un sólido amarillo (0,028 g; 28%).

P. f. = 310 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 9,37 (d, 1H, *J* = 6,6 Hz); 8,94 (s, 1H); 8,76 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 8,48 (d, 1H, *J* = 6,6 Hz); 7,69 (d, 1H, *J* = 1,5 Hz); 7,17 (dd, 1H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 1,5 Hz); 6,02 (s, 2H); 4,23 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 3,95 (s, 3H); 3,14 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 2,98 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 1,46-1,25 (m, 9H) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 2974; 2939; 2885; 1742; 1624; 1572; 1519; 1412; 1344; 1273; 1163; 830 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₂₃H₂₆N₃O₃Br·1H₂O; C: 56,33; H: 5,75; N: 8,57; encontrado: C: 56,14; H: 6,02; N: 8,67.

Ejemplo 20. Preparación de yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23, Esquema 3)

Una suspensión de **21** (86,8 mg; 0,3 mmol) en 1,3-diyodopropano (5 mL) se irradia en un sintetizador por microondas durante dos periodos de 10 minutos con una potencia de 300 vatios, apareciendo un precipitado el cual se filtra en caliente y se lava sucesivamente con acetona (2 x 5 mL) y éter dietílico (2 x 5 mL). El precipitado formado se recristaliza en etanol, obteniéndose un sólido naranja (96 mg; 55 %).

P. f. > 300 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 9,18 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz); 9,04 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz); 8,87 (s, 1H); 8,37 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 7,20 (s, 1H); 7,08 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz); 5,19 (s_{ap.}, 2H); 3,94 (s, 3H); 3,35 (s_{ap.}, 2H); 2,97 (c, 2H, *J* = 7,2 Hz); 2,90 (c, 2H, *J* = 7,2 Hz); 2,59 (s_{ap.}, 2H); 1,40 (t, 6H, *J* = 7,0 Hz) ppm.

Ejemplo 21. Preparación de bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxi-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24, Esquema 3)

Una mezcla de **22** (38,7 mg; 0,08 mmol) y HBr (48%, 1 mL) se calienta a reflujo durante 3 horas. A continuación, la mezcla de reacción se deja enfriar y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se tritura en éter dietílico, proporcionando un sólido naranja (30,9 mg; 85%).

5 P. f. = 234-235 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 9,33 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz); 8,90 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz); 8,58 (s, 1H); 8,47 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz); 7,68 (s, 1H); 7,17 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz); 5,96 (s, 2H); 3,97 (s, 3H); 3,15 (c, 2H, *J* = 7,2 Hz); 2,99 (c, 2H, *J* = 7,2 Hz); 1,39 (t_{ap}, 6H, *J* = 6,8 Hz) ppm.

10 **Ejemplo 22. Preparación de 1-metil-7-metoxi-9-(pent-4-inil)pirido[3,4-b]indol (Compuesto 25, Esquema 3)**

Una mezcla de harmina **18** (1,06 g; 5 mmol), 5-cloro-1-pentino (0,72 g; 7 mmol), BBDE-Cl como catalizador de transferencia de fase (0,11 g; 0,25 mmol), hidróxido potásico pulverizado seco (0,50 g; 9 mmol), y carbonato potásico anhidro (1,24 g; 9
15 mmol) en acetonitrilo seco (50 mL); se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 400 horas. La suspensión resultante se filtra, lavando el residuo insoluble con acetonitrilo (3 x 10 mL). Los filtrados se concentraron a sequedad, el residuo se purifica mediante cromatografía en columna de sílica gel utilizando AcOEt (Acetato de etilo) como eluyente. El producto se recristaliza en hexano, obteniendo un sólido
20 blanco (0,84 g, 61%).

P. f.= 107-109 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 8,29 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz); 7,97 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 7,73 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz); 6,99 (d, 1H, *J* = 2,2 Hz); 6,89 (dd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,2 Hz); 4,64 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz); 3,95 (s, 3H); 3,03 (s, 3H); 2,32 (td, 2H, *J* = 6,6 Hz, *J* = 2,5 Hz); 2,13 (t, 1H, *J* = 2,5 Hz); 2,11-2,01 (m, 2H) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3172; 2982;
25 2103; 1621; 1565; 1449; 1407; 1244; 1162; 1047; 809 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₁₈H₁₈N₂O; C: 77,67; H: 6,52; N: 10,06; encontrado: C: 77,30; H: 6,67; N: 9,92.

30 **Ejemplo 23. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-1-metil-7-metoxi-9-(pent-4-inil)pirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 26, Esquema 3)**

A una disolución de **25** (0,26 g; 1 mmol) en diclorometano (5 mL), con agitación constante y a temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de O-mesitilensulfonato de hidroxilamina (MSH) (1,4 mmol), en diclorometano (2 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras los cuales se añade

éter dietílico a la mezcla para precipitar la sal formada. El sólido se filtra y lava sucesivamente con acetona y diclorometano. Se recrystaliza en etanol obteniéndose un sólido amarillo (0,43 g; 88%).

P. f. = 201-202 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; DMSO- d_6): δ 8,54 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz); 8,43 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz); 8,30 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 7,67 (s, 2H); 7,37 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz); 7,06 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,2$ Hz); 4,72 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz); 3,95 (s, 3H); 3,15 (s, 3H); 2,97 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz); 2,31 (td, 2H, $J = 6,8$ Hz, $J = 2,5$ Hz); 2,00-1,94 (m, 2H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3264; 3191; 3086; 2971; 1622; 1578; 1452; 1233; 1205; 1009; 827; 676 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$; C: 65,70; H: 6,33; N: 8,51; encontrado C: 65,33; H: 6,50; N: 8,26.

Ejemplo 24. Preparación de mesitilensulfonato de 14-metoxi-16-(pent-4-inil)acenafto[1'',2'':3',4']piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-9-inio (Compuesto 27, Esquema 3)

Una mezcla de **26** (0,10 g; 0,2 mmol), acenaftoquinona (0,036 g; 0,2 mmol), acetato sódico anhidro (0,016 g; 0,2 mmol) y etanol (10 mL), se calienta a reflujo durante 1 hora. El sólido obtenido se filtra en caliente, lavándose sucesivamente con etanol caliente (5 mL) y acetona caliente (5 mL). Finalmente se recrystaliza en acetona-ácido acético. Se obtiene un sólido anaranjado (0,085 g; 67%).

P. f. = 273-274 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; DMSO- d_6): δ 9,55 (s, 1H); 9,37 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz); 8,75 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz); 8,71 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz); 8,58 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz); 8,38 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz); 8,34 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz); 8,02 (t_{ap} , 2H, $J = 7,4$ Hz); 7,52 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz); 7,18 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,2$ Hz); 5,24 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz); 4,05 (s, 3H); 2,75 (s, 1H); 2,54-2,51 (m, 2H); 2,38-2,29 (m, 2H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 2932; 1621; 1574; 1544; 1409; 1250; 1223; 1161; 829; 678 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{39}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; C: 69,31; H: 5,52; N: 6,22; encontrado C: 69,07; H: 5,19; N: 5,91.

Ejemplo 25. Preparación de mesitilensulfonato de 2,3-di-(2-furil)-10-metoxi-12-(pent-4-inil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 28, Esquema 3)

Una mezcla de **26** (0,10 g; 0,2 mmol), furilo (0,04 g; 0,2 mmol) y acetato sódico anhidro (0,016 g; 0,2 mmol) en etanol (10 mL) se calentó a reflujo durante 5 horas. La disolución resultante se concentró a sequedad y el residuo se trituró con acetona-éter

dietílico. El sólido así obtenido, se filtró y se lavó sucesivamente con éter dietílico, agua y acetona. Se obtuvo un sólido color ocre (0,04 g; 43%).

P. f. = 279-280 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CD₃OD): δ 9,27 (s, 1H); 9,19 (d, 1H, *J* = 6,6 Hz); 8,75 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 8,36 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 7,95 (d, 1H, *J* = 1,1 Hz); 7,91 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz), 7,51 (d, 1H, *J* = 1,8 Hz); 7,20 (dd, 1H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,1 Hz); 7,18 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz); 6,81 (dd, 1H, *J* = 3,6 Hz, *J* = 1,8 Hz); 6,73 (dd, 1H, *J* = 3,6 Hz, *J* = 1,8 Hz); 6,58 (d, 1H, *J* = 3,7 Hz); 5,14 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 4,05 (s, 3H); 2,50 (t, 1H, *J* = 2,5 Hz); 2,47 (td, 2H, *J* = 6,6 Hz, *J* = 2,5 Hz); 2,34-2,26 (m, 2H) ppm. IR (*v*_{max}, KBr): 2957; 1683; 1639; 1621; 1563; 1411; 1210; 1017; 824; 679; 644 cm⁻¹. Análisis Elemental para C₃₇H₃₃N₃O₆S·1H₂O; C: 66,75; H: 5,30; N: 6,31; encontrado C: 66,44; H: 5,38; N: 6,25.

Ejemplo 26. Preparación de 1,10-bis-(1-metil-7-metoxipirido[3,4-b]indol-9-il)-deca-4,6-diino (Compuesto 29, Esquema 3)

Una mezcla de **25** (0,26 g; 1 mmol) y acetato cúprico (0,90 g; 5 mmol) en acetonitrilo (20 mL), se refluxe durante 48 horas, se enfría la mezcla de reacción, añadiéndose a la misma agua (10 mL) y amoníaco (25%) (5 mL). La mezcla se extrae con diclorometano (30 mL), la fase orgánica se seca con sulfato magnésico anhidro y se concentra a sequedad. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna en gel de sílice, empleando como eluyente acetona/etanol (8:2 v/v). El producto se recrystalizó en acetona, obteniendo un sólido pálido amarillo (0,12 g; 45 %).

P. f. = 184-185 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 8,29 (d, 2H, *J* = 5,5 Hz); 7,97 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz); 7,74 (d, 2H, *J* = 5,1 Hz); 6,89 (d, 2H, *J* = 2,2 Hz); 6,89 (dd, 2H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,2 Hz); 4,64 (t, 4H, *J* = 7,3 Hz); 3,94 (s, 6H); 3,04 (s, 6H); 2,38 (t, 4H, *J* = 6,6 Hz); 2,13-2,04 (m, 4H) ppm. IR (*v*_{max}, KBr): 2966; 2115; 1617; 1558; 1414; 1238; 1108; 839; 675 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₃₆H₃₄N₄O₂; C: 77,95; H: 6,18; N: 10,10; encontrado C: 77,71; H: 6,33; N: 9,84.

Ejemplo 27. Preparación de dimesitilensulfonato de 9,9'-(deca-4,6-diin-1,10-diil)-bis-(2-amino-1-metil-7-metoxipirido[3,4-b]indol-2-inio) (Compuesto 30, Esquema 3)

A una suspensión de **29** (0,55 g; 1 mmol) en diclorometano (5 mL), con agitación constante y a temperatura ambiente, se añadió gota a gota una disolución de O-

mesitilensulfonato de hidroxilamina (MSH) (3 mL) en diclorometano (2 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, añadiéndose éter dietílico para favorecer la precipitación de la sal. El sólido se filtró y se lavó sucesivamente con acetona y diclorometano, recristalizándose en etanol. Se obtiene un sólido blanco
 5 (0,55 g; 90%).

P. f. = 250-251 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 8,54 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz); 8,43 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz); 8,30 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz); 7,67 (s, 4H); 7,35 (d, 2H, *J* = 1,8 Hz); 7,05 (dd, 2H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 1,8 Hz); 4,70 (t, 4H, *J* = 7,3 Hz); 3,94 (s, 6H); 3,13 (s, 6H); 2,47-2,43 (m, 4H); 2,02-1,97 (m, 4H) ppm. IR (*v*_{max}, KBr): 3432; 3252; 3139; 2934;
 10 2328; 1624; 1573; 1456; 1249; 1228; 1167; 1085; 1014; 816; 679 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₅₄H₆₀N₆O₈S₂; C: 65,83, H: 6,14, N: 8,53; encontrado: C: 65,57, H: 6,22, N: 8,40.

Ejemplo 28. Preparación de dimesitilensulfonato de 12,12'-(deca-4,6-diin-1,10-diil)-bis-(2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio)
 15 **(Compuesto 31, Esquema 3)**

Una mezcla de **30** (0,10 g; 0,1 mmol), 3,4-hexanodiona (0,025 g; 0,2 mmol), acetato sódico anhidro (0,008 g; 0,1 mmol) y etanol (10 mL), se calentó a reflujo durante 24 horas. La disolución resultante se concentró a sequedad, triturándose el residuo en una mezcla acetona-éter dietílico y lavándose con la mínima cantidad de agua fría (1 mL), secándose finalmente a vacío. Se obtiene un sólido (0,06 g; 52%).
 20

P. f. = 292-293 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CD₃OD, CF₃COOD): δ 9,10 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz); 8,73 (s, 2H); 8,64 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz); 8,28 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz); 7,22 (d, 2H, *J* = 2,5 Hz); 7,13 (dd, 2H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,2 Hz); 5,73 (t, 4H, *J* = 7,5 Hz); 3,99 (s, 6H); 3,16 (c, 4H, *J* = 7,3 Hz); 3,05 (c, 4H, *J* = 7,3 Hz); 2,48-2,45 (m, 4H); 2,25-2,18 (m, 4H); 1,51-1,45 (m, 12H) ppm. IR (*v*_{max}, KBr): 2954; 1619; 1558; 1414; 1202; 1178; 1085; 679 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₆₆H₇₂N₆O₈S₂·1H₂O; C: 68,37; H: 6,43; N: 7,25; encontrado: C: 68,04; H: 6,69; N: 7,43.
 25

30

Ejemplo 29. Determinación de la viabilidad celular de la línea THP-1 preincubada durante 24 h con concentraciones crecientes de diversos compuestos (Fig. 1)

La línea pro-monocítica humana THP-1 se incubó durante 24 h en medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) y

concentraciones crecientes de los compuestos **24** (Fig. 1A), **17** (Fig. 1B), **7** (Fig. 1C), **23** (Fig. 1D) y **22** (Fig. 1E). Para determinar el efecto de la estimulación celular sobre la viabilidad, duplicados de los cultivos se estimularon con 100 ng/mL de lipopolisacárido bacteriano (LPS, SIGMA-Aldrich) durante las últimas 4 horas.

5

La viabilidad celular se determinó en cada caso por citometría de flujo mediante el porcentaje de exclusión de yoduro de propidio añadido a una concentración final de 0,5 µg/mL. El análisis mediante citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur con el software CellQuest Pro (BD Bioscience, San José, CA, USA).

10

Los compuestos **24** y **7** no afectaron a la viabilidad celular en un rango de concentraciones de 10µM -100µM. Los compuestos **23**, **22** y **17** mostraron toxicidad a concentraciones superiores a 10µM.

15 **Ejemplo 30. Producción de TNF- α inducida por LPS (100 ng/ml) en la línea celular promonocítica humana THP-1 en presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos (Fig. 2)**

Células THP-1 se cultivaron durante 24 h en RPMI/5% FCS en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos elegidas dentro de los rangos que no mostraron citotoxicidad. Se estimularon con 100 ng/ml de LPS durante las últimas 4 horas de cultivo. La determinación de las concentraciones de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α en el sobrenadante de los cultivos se realizó mediante Human TNF ELISA Set (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de la proteína recombinante humana. La absorbancia se midió a 450 nm en el lector de placas Synergy 4 analizando los resultados con el software Gen 5 (Biotek).

Se muestran los valores (pg/ml de TNF- α /10⁵ células) como media \pm SD de 5 experimentos realizados con el compuesto **24** (Fig. 2A), media \pm SD de 9 experimentos realizados con el compuesto **17** (Fig. 2B), media de 2 experimentos realizados con el compuesto **7** (Fig. 2C), media de 2 experimentos realizados con el compuesto **23** (Fig. 2D) y media \pm SD de 3 experimentos realizados con el compuesto **22** (Fig. 2E).

Los 5 compuestos provocaron una disminución de la producción de TNF- α inducida por LPS. Los mejores resultados en función de la dosis-respuesta se obtuvieron en presencia del compuesto 17.

- 5 A continuación se muestra en la tabla 1 la inhibición de la producción de TNF- α de los compuestos anteriores y de algunos compuestos más:

Tabla 1.- Inhibición (%) de la producción de TNF- α por compuestos de Fórmulas (I) y (III).

Compuesto (ejemplo)	% Inhibición TNF- α en células THP-1							
	0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	IC ₅₀ (μ M)
4 (3)				89				
7 (6)		44	56	29	47			
8 (7)				88				
13 (11)				94				
17 (15)	-0,97	34,9	63,4	87,8				4,49
20 (17)				76				
22 (19)		51	67	45	94			11,5
23 (20)		11	36	72	79			
24 (21)				38	29	35	40	
27 (24)				94				
28 (25)				87				
31 (28)				34	90			

10

Ejemplo 31. Efecto del compuesto 17 sobre la producción de TNF- α estimulada por LPS en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Fig. 3)

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron a partir de donaciones de sangre de individuos sanos mediante centrifugación en gradiente de ficoll (Amersham Biosciences). Se cultivaron en RPMI/10% FCS durante 24 h en presencia de concentraciones crecientes del compuesto 17 y se estimularon con 10 ng/mL de LPS durante las últimas 4 horas de cultivo. El TNF- α secretado se evaluó en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA como en el caso anterior. Los resultados

15

(pg/ml de TNF- α /10⁵ células) se expresan como media \pm SD de 5 experimentos independientes.

A bajas concentraciones (0.1 μ M-1 μ M) la respuesta interindividual fue muy variable.

5 Sin embargo a 5 y 10 μ M se observó una inhibición de la producción de TNF en todos los cultivos.

Ejemplo 32. Efecto del compuesto 17 sobre la producción de TNF- α estimulada por LPS en monocitos aislados de sangre periférica de individuos sanos (Fig. 4)

10 Se aislaron monocitos (células CD14+) a partir de PBMCs de individuos sanos utilizando microesferas magnéticas asociadas a anticuerpo anti-CD14 humano (Miltenyi Biotec). Las separaciones celulares se realizaron con el sistema automático AutoMacs o de forma manual con columnas magnéticas (Miltenyi Biotec). Se verificó mediante citometría de flujo que en todos los casos la pureza era superior al 90% en
15 las fracciones celulares separadas.

Una vez aislados se cultivaron en RPMI/10% FCS durante 24 h en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **17** y se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante las últimas 4 horas de cultivo. El TNF- α secretado se evaluó en los
20 sobrenadantes de cultivo mediante ELISA como en el caso anterior. Los resultados (pg/ml de TNF- α /10⁵ células) se expresan como media \pm SD de 8 experimentos independientes.

En monocitos aislados se observó inhibición de la producción de TNF- α en los cultivos
25 pretratados con el compuesto **17** a una concentración final de 1 o 10 μ M.

Ejemplo 33. Cálculo de la concentración inhibidora al 50% (IC₅₀) para el compuesto 17 en células THP-1 (Fig. 5)

Tomando como referencia la concentración de TNF- α secretada al medio estimulada
30 mediante el tratamiento de 4 horas con 100 ng/mL de LPS en ausencia de compuesto, se ha calculado el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones testadas del compuesto **17** en cada experimento y se ha calculado la media del porcentaje de inhibición para cada concentración en los 9 experimentos realizados. Con estos valores se ha elaborado una recta de regresión para interpolar el 50% de

inhibición que en este caso correspondería a una concentración de 4,49 μM del compuesto **17** durante 20 h previas a la estimulación.

Ejemplo 34. Cálculo de la concentración inhibidora al 50% (IC_{50}) para el compuesto **17 en PBMCs (Fig. 6)**

Tomando como referencia la concentración de $\text{TNF-}\alpha$ secretada al medio estimulada mediante el tratamiento de 4 horas con 10 ng/mL de LPS en ausencia de compuesto, se ha calculado el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones testadas del compuesto **17** como en el caso anterior. La concentración calculada en PBMCs es de 1,83 μM de compuesto **17** durante 20 h previas a la estimulación.

Tabla 2. - Inhibición (%) de la producción de $\text{TNF-}\alpha$ por el compuesto 17

Compuesto (ejemplo)	% Inhibición $\text{TNF-}\alpha$ en PBMCs							
	0,1 μM	1 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM	IC_{50} (μM)
17 (15)	22,7	38,8	71,2	69,2				3,91

Ejemplo 35. Cálculo de la concentración inhibidora al 50% (IC_{50}) para el compuesto **17 en monocitos humanos aislados de sangre periférica (Fig. 7)**

Tomando como referencia la concentración de $\text{TNF-}\alpha$ secretada al medio estimulada mediante el tratamiento de 4 horas con 10 ng/mL de LPS en ausencia de compuesto, se ha calculado el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones testadas del compuesto **17** como en el caso anterior. La concentración calculada en monocitos humanos (células CD14+) en cultivo es de 3,22 μM de compuesto **17** durante 20 h previas a la estimulación.

Tabla 3.- Inhibición (%) de la producción de $\text{TNF-}\alpha$ por el compuesto 17

Compuesto (ejemplo)	% Inhibición $\text{TNF-}\alpha$ en monocitos humanos							
	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM	IC_{50} (μM)
17 (15)	27	40		95,3				3,22

Ejemplo 36. Análisis del efecto de la administración *in vivo* del compuesto 17 (Fig. 8)

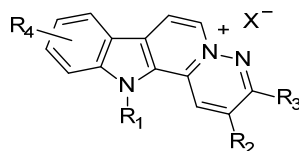
5 Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL6 (Charles River, Barcelona, España). Tras la recepción los ratones se mantuvieron en jaulas ventiladas para minimizar la infección por patógenos. Los ratones utilizados tenían 8-9 semanas de edad y un peso aproximado de 20 gr.

10 Se administraron intra-peritonealmente 2 dosis del compuesto 17 (2mg/kg en 200 μ L de suero salino) con un intervalo de 18h. Cuatro horas después de la segunda dosis se sacrificaron los animales, se extirparon los bazo y se disgregaron mecánicamente para obtener suspensiones celulares. Las células del bazo se cultivaron "in vitro" en RPMI/10% FBS en presencia o ausencia de LPS (10ng/mL) durante 4h. Los niveles de TNF- α secretado se midieron en el sobrenadante de cultivo mediante citometría de
15 flujo (CBA). Control vs LPS $p= 0.0156$ (* $p<0.05$) test de Wilcoxon. LPS vs T78d+LPS $p= 0.0205$ (* $p<0.05$) test de Mann-Whitney.

20 Como se aprecia en la Fig. 8 las células de ratones que han sido tratados *in vivo* con el compuesto 17 muestran una producción significativamente menor de TNF- α cuando son estimuladas con LPS. Este resultado indica que el compuesto es efectivo cuando es administrado *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general (I):



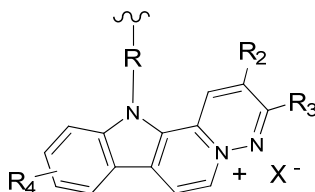
5

(I)

donde:

R₁ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), alquenilo (C₂-C₁₀), alquinilo (C₂-C₁₀), -(CH₂)_nCO₂R₁' , -(CH₂)_mR₁'', -(CH₂)_pCONHR₁'''' o el grupo de fórmula (II):

10



(II)

15 donde R se selecciona de la lista que comprende alquilo (C₁-C₂₀), alquenilo (C₂-C₂₀), alquinilo (C₂-C₂₀), -(CH₂)_nCO₂R₁'-O₂C(CH₂)_n- ó -(CH₂)_pCONHR₁''''-NHOC(CH₂)_p-; n, m o p tienen un valor de entre 0 y 5 y R₁' se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C₁-C₁₀), R₁'' se selecciona de entre halógeno, alquenilo (C₂-C₄) o alquinilo (C₂-C₄) y R₁'''' se selecciona de entre alquilo (C₁-C₄), alquenilo (C₂-C₄) o alquinilo (C₂-C₄);

20

R₂ y R₃, son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₆), arilo, heteroarilo o R₂ y R₃ pueden estar enlazados entre si formando parte de un anillo, saturado o aromático;

R₄ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), halógeno, nitro, amino, hidroxilo, O-R₄' , donde R₄' se selecciona de entre un alquilo (C₁-C₁₂), arilo, aralquilo o heteroarilo; y

25

X⁻ es un anión biológica o farmacéuticamente aceptable;

o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de un medicamento para la inhibición de la producción de TNF-α.

2. Uso según la reivindicación 1, donde R_1 se selecciona de entre hidrógeno, $-(CH_2)_nCO_2R_1'$ o $-(CH_2)_mR_1''$.

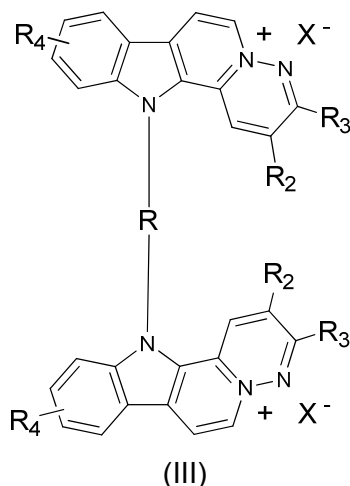
5 3. Uso según la reivindicación anterior, donde R_1' se selecciona de entre hidrógeno o alquilo (C_1-C_{10}) y n es 0 ó 1.

4. Uso según la reivindicación 2, donde R_1'' se selecciona de entre halógeno o un alquínilo (C_2-C_3) y m tiene un valor de 2 a 4.

10

5. Uso según la reivindicación anterior, donde R_1'' es yodo o etinilo y m es 3.

6. Uso según la reivindicación 1, donde R_1 es el grupo de fórmula (II) y dicho compuesto es el de fórmula general (III):



15

donde R, R_2 , R_3 , R_4 y X^- se han descrito en la reivindicación 1.

20 7. Uso según la reivindicación anterior, donde R es alquilo (C_5-C_{15}), alquénilo (C_5-C_{15}) o alquínilo (C_5-C_{15}).

8. Uso según la reivindicación anterior, donde R es deca-4,6-diin-1,10-diilo.

25 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R_2 y R_3 , son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre metilo, etilo, 2-furilo o 1,8-naftodiilo.

10. Uso según la reivindicación anterior, donde R_2 y R_3 son iguales.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde R_4 se selecciona de entre amino, bromo, nitro, metoxilo o benzoxilo.
- 5 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde X^- es haluro o mesitilensulfonato.
13. Uso según la reivindicación anterior, donde el haluro es bromuro.
- 10 14. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona de entre:
- mesitilensulfonato de 9-bromo-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
- mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-11-nitropiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-
- 15 inio,
- dicloruro de 11-amonio-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
- mesitilensulfonato de 10-benciloxi-12-*terc*-butoxicarbonil-2,3-
- dietilpiridazino[1',6':1,2] pirido[3,4-b]indol-5-inio,
- bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
- 20 mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-
- 5-inio,
- bromuro de 2,3-dietil-12-etoxicarbonilmetil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-
- b]indol-5-inio,
- yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-
- 25 b]indol-5-inio,
- bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-
- b]indol-5-inio,
- mesitilensulfonato de 14-metoxi-16-(pent-4-
- inil)acenafto[1'',2'':3',4']piridazino[1',6':1,2] pirido[3,4-b]indol-9-inio,
- 30 mesitilensulfonato de 2,3-di-(2-furil)-10-metoxi-12-(pent-4-
- inil)piridazino[1',6':1,2]pirido [3,4-b]indol-5-inio y
- dimesitilensulfonato de 12,12'-(deca-4,6-diin-1,10-diil)-bis-(2,3-dietil-10-
- metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio).

15. Uso según la reivindicación anterior, donde el compuesto es bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio.
16. Uso de un compuesto de fórmula general (I) o (III) según se describen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias.
17. Uso según la reivindicación anterior, donde las enfermedades inflamatorias se seleccionan de la lista que comprende artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática autoinmune, osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, uveitis, asma, bronquitis, enfermedad obstructiva de las vías respiratorias crónica, psoriasis, rinitis alérgica, espondilitis anquilosante, hidradenitis supurativa, dermatitis y procesos inflamatorios asociados a una enfermedad renal.
18. Compuesto seleccionado de la lista que comprende:
yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio y
bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio.
19. Composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en la reivindicación 18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
20. Uso del compuesto según la reivindicación 18, para la elaboración de un medicamento.

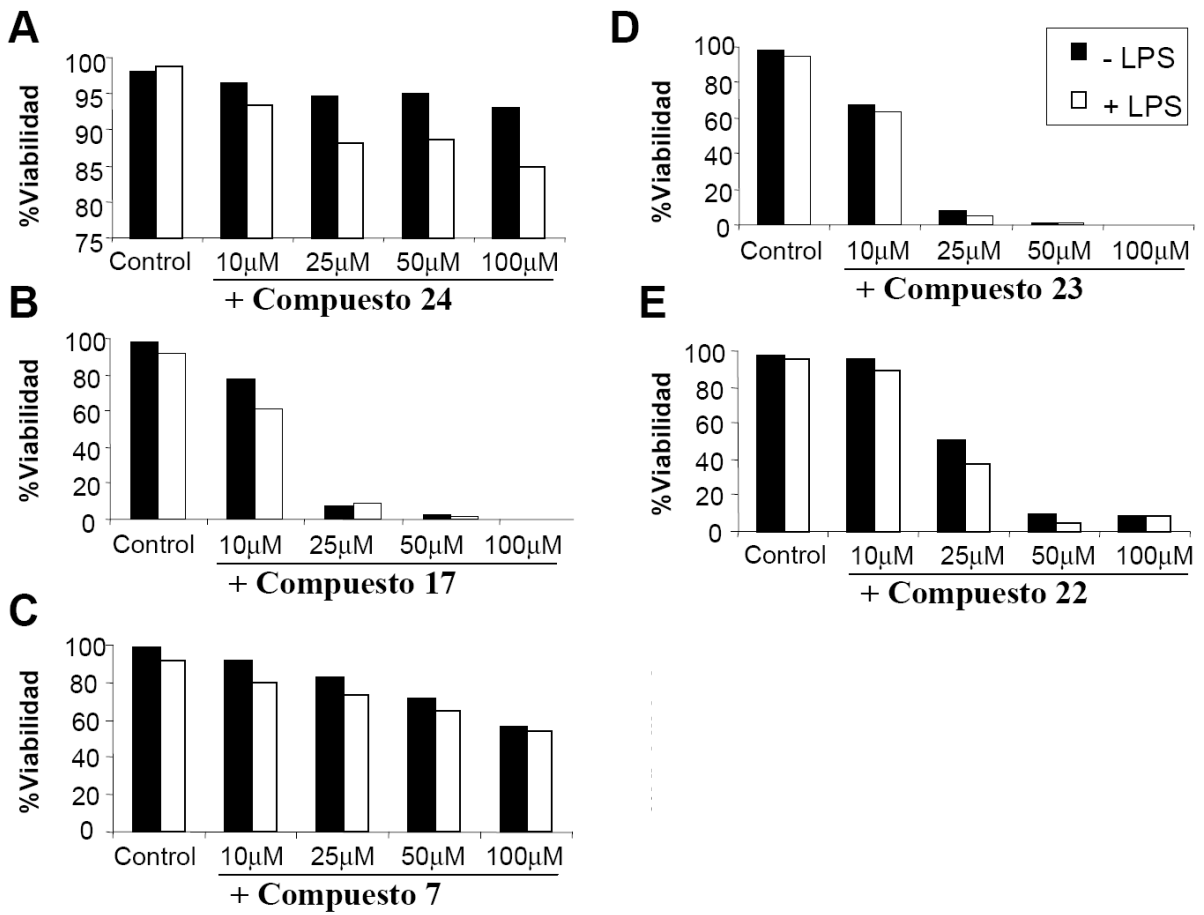


Fig. 1

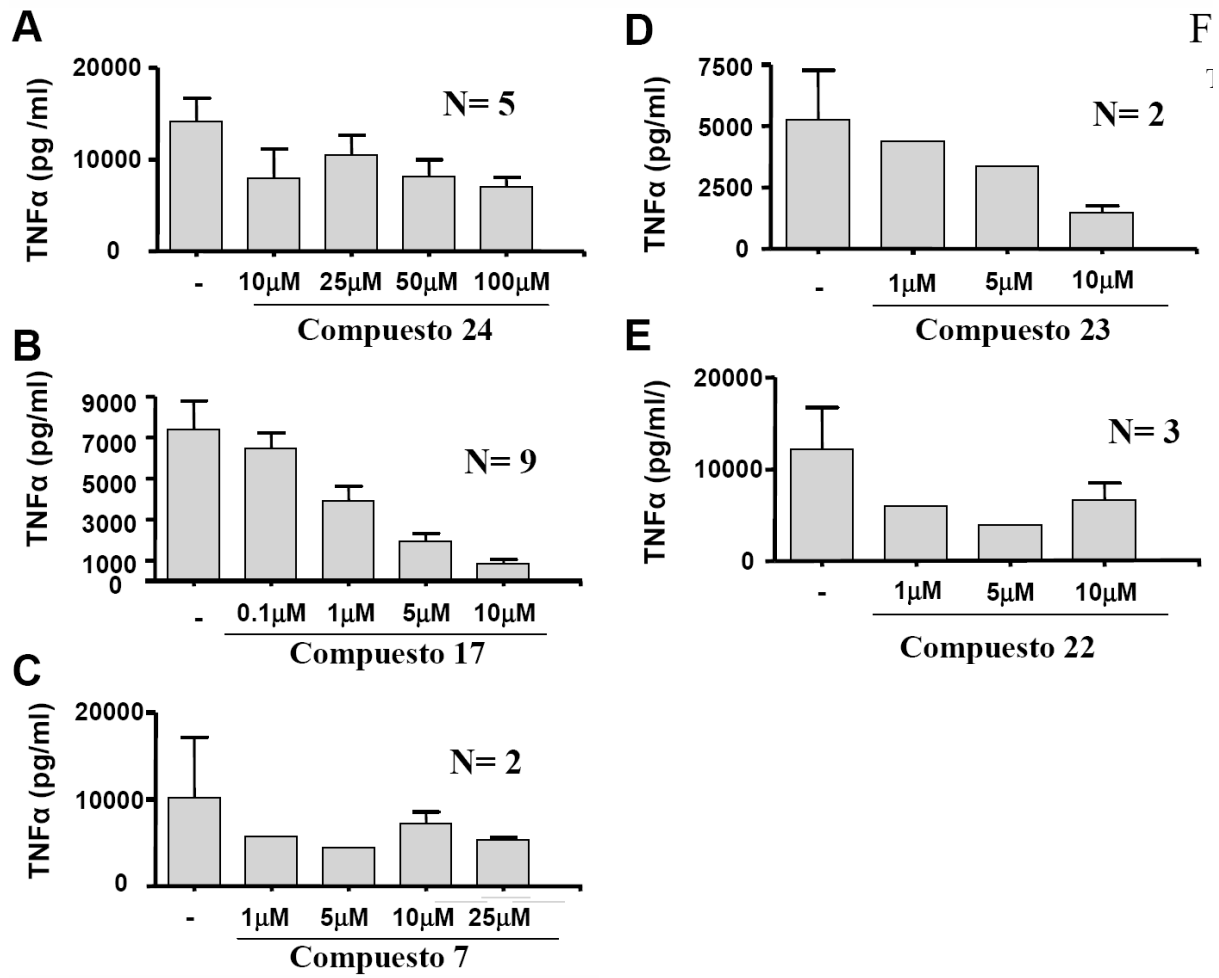


Fig. 2

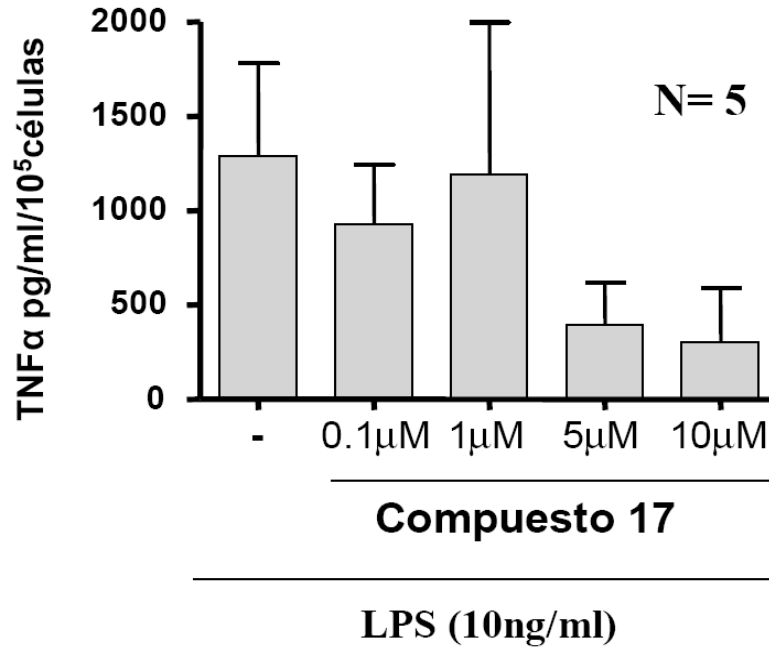


Fig. 3

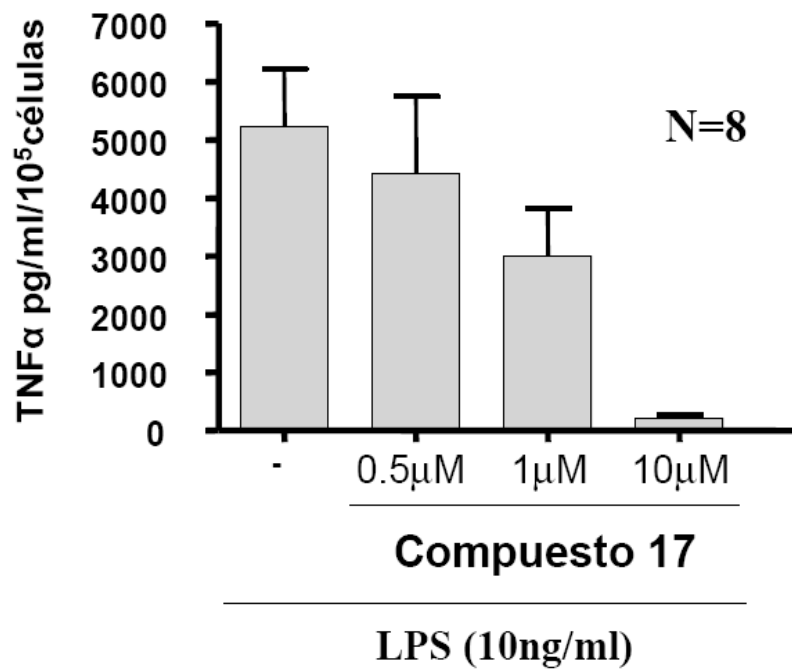


Fig. 4

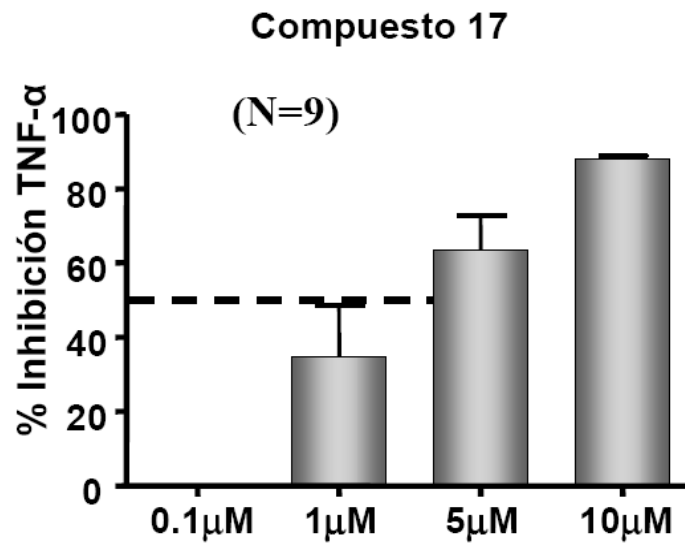


Fig. 5

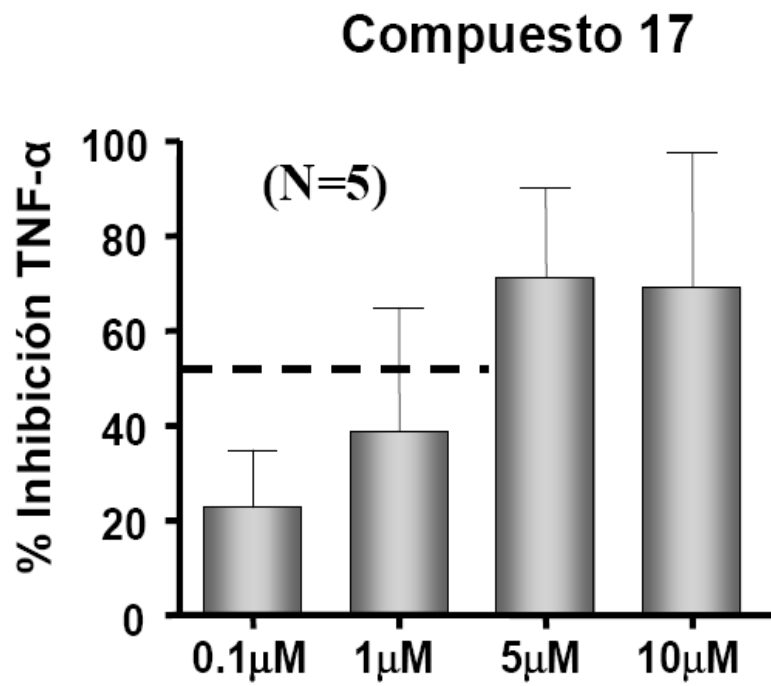


Fig. 6

Compuesto 17

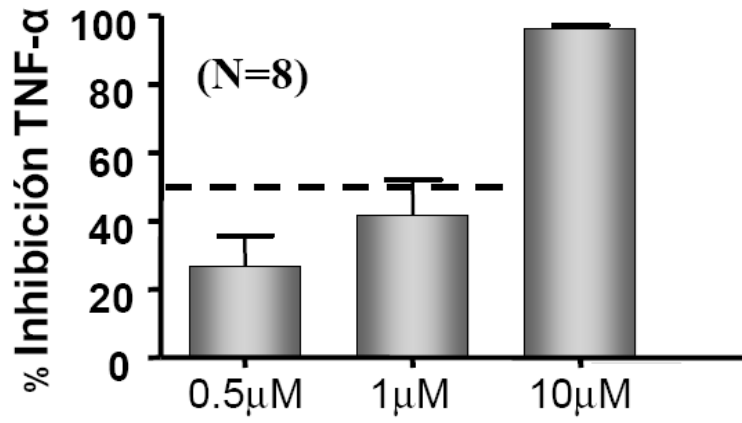


Fig. 7

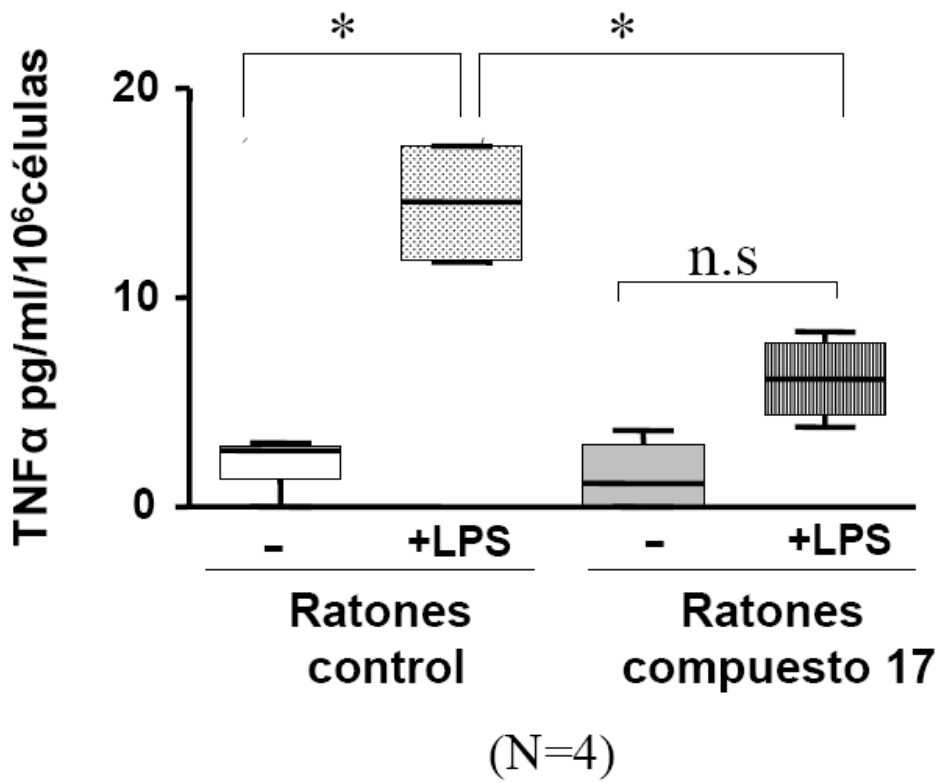


Fig. 8