

# Mitonafida y amonafida

## Mitonafide and Amonafide

BRAÑA, F. M.

Departamento de Química Farmacéutica. Universidad de San Pablo CEU. Madrid.

### RESUMEN

La naftalimidias constituyen una familia de nuevos agentes intercalantes con propiedades anticancerosas. En este trabajo, se describe el diseño, la síntesis y la actividad quimioterapéutica, junto a otros estudios preclínicos realizados con vistas a la iniciación de los ensayos clínicos.

**Palabras clave:** Mitonafida. Amonafida. Agentes intercalantes.

### ABSTRACT

The naphthalimides are a family of new intercalator agents with antitumor properties. Here, we describe the design, synthesis and chemotherapeutic activity, together with the results of preclinical studies in order to initiate the clinical essays.

**Key words:** Mitonafide. Amonafide. Intercalant agents.

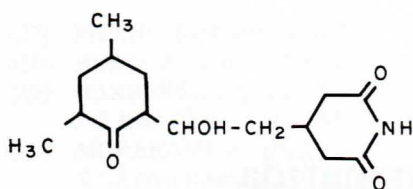
Recibido: 13-3-1995.

Aceptado: 10-5-1995.

BIBLID [0004-2927(1995) 36:3; 377-415]

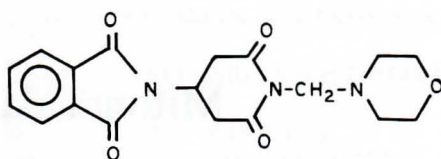
## 1. DISEÑO

En el año 1972, Braña y col. iniciaron una línea de investigación dirigida hacia la síntesis de nuevos compuestos con acción citostática. Para el diseño de la nueva molécula, estos autores consideraron como modelos de agentes carcinostáticos los que se indican a continuación: la cicloheximida 1, el CG-603 2, el ácido aristolóchico 3 y la tilorona 4.



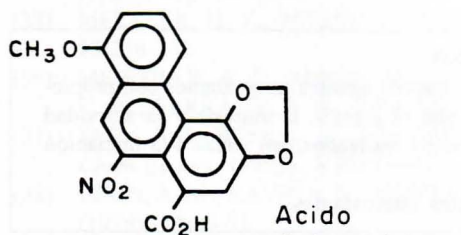
Cicloheximida

1

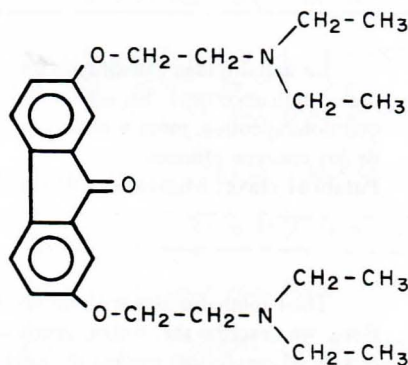


CG - 603

2

Acido  
Aristolóchico

3



Tilorona

4

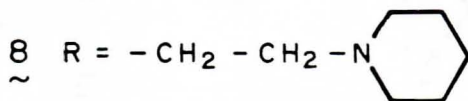
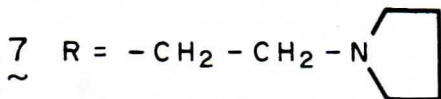
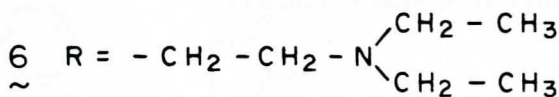
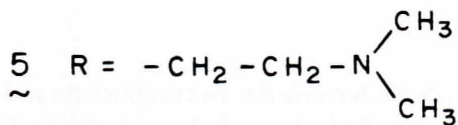
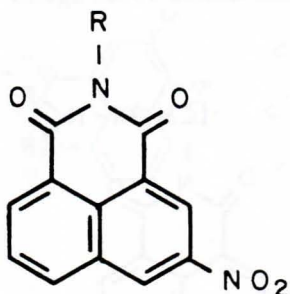
Al considerar estas estructuras, interesó sintetizar un compuesto que portase el sistema de  $\beta$ -nitronaftaleno que aparece en 3, una imida cíclica de seis eslabones presente en 1 y 2, y una cadena lateral básica, del tipo de dialquilaminoalquilo, como figura en los compuestos 2 y 4.

La solución más sencilla pareció la obtención de derivados de la 3-nitro-1,8-naftalimida sustituida en el nitrógeno imídico, por lo que se procedió a la síntesis de los compuestos 5-8 como modelos a estudiar biológicamente.

Por otra parte, el estudio bibliográfico sobre este tipo de estructuras mostró que la utilización de 1,8-naftalimidias en medicina humana o veterinaria es relativamente reciente, habiéndose encontrado propiedades antiparasitarias (1-3), fungicidas (4), tuberculostáticas (4), antidepressivas y ansiolíticas (5), y antivíricas (6). Sin embargo no se encontraron antecedentes acerca del estudio de estas sustancias como agentes antitumorales.

La síntesis de los compuestos 5-8, figura en una patente del año 1973 (7).

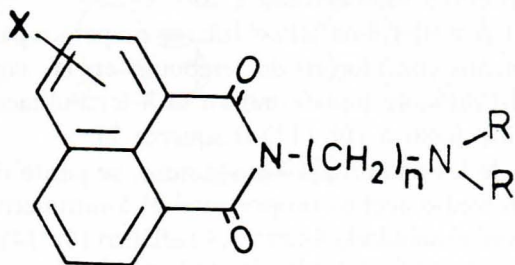
La extraordinaria acción inhibitoria de la replicación celular que presentaron los compuestos 5 y 7, superior incluso a la de la 6-mercaptapurina (8, 9), indujo



a extender la síntesis y el estudio de la actividad citostática a otras naftalimidias, modificando la naturaleza de la cadena lateral, así como la del sustituyente aromático.

Como estudio preliminar, se encontró que la ausencia de la cadena lateral básica producía una caída dramática en la actividad (10), por lo que todos los compuestos a sintetizar deberían de portar este farmacóforo.

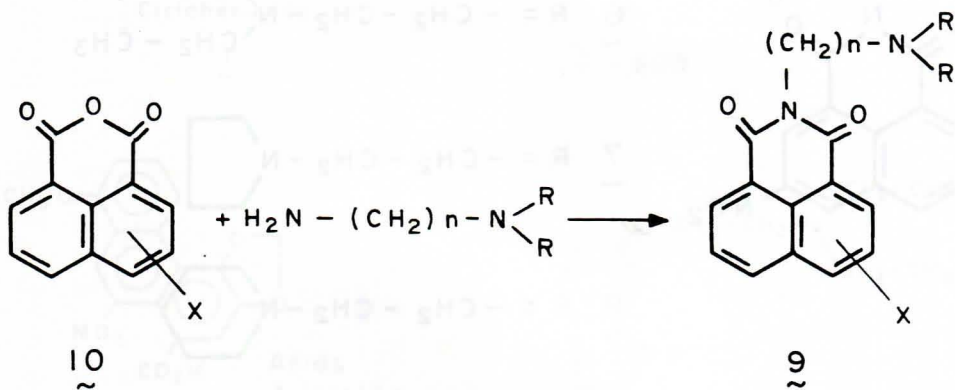
En resumen, se abordó la síntesis de naftalimidias sustituidas —cuyo nombre de acuerdo con la IUPAC es el de benzo-[d,e]-iso-quinolein-1,3-dionas— de fórmula general 9 para conocer la influencia sobre la actividad del sustituyente X, tanto en cuanto a su naturaleza, como en cuanto a la posición que ocupa en el sistema aromático, así como del número de metilenos y de la naturaleza de los grupos R unidos al nitrógeno.



9  
~

## 2. SÍNTESIS

La síntesis de la mayoría de los compuestos se llevó a cabo por reacción del correspondiente anhídrido 1,8-naftálico sustituido 10 y una amina como agente nucleófilo (Esquema 1) (10, 11).



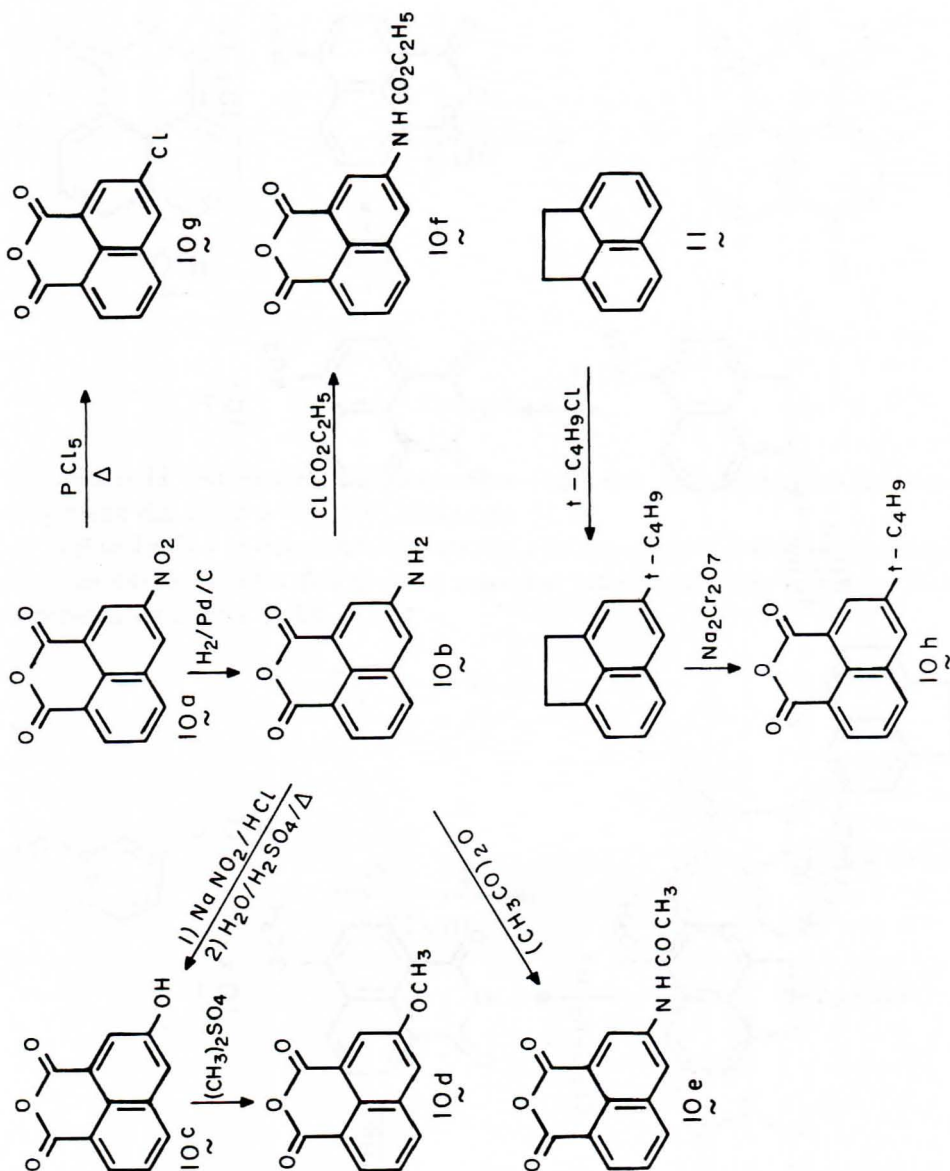
Para la preparación de los anhídridos de partida 10 se han utilizado métodos convencionales, excepto para los anhídridos 2-nitro-1,8-naftálico 10a y el 4-cloro-1,8-naftálico 10q que son comerciales. Así, para la síntesis de los anhídridos 3-sustituidos se partió de 10a ( $X=3\text{-NO}_2$ ) que por hidrogenación con paladio sobre carbono se transformó en el 3-aminoderivado 10b, el cual por diazotación e hidrólisis en medio ácido, dio lugar al fenol 10c. La metilación de 10c con sulfato de metilo condujo al metoxiderivado 10d (12). Por otra parte el tratamiento de 10b con anhídrido acético y cloroformiato de etilo proporcionó los correspondientes anhídridos sustituidos con 3-acetilamino 10e y 3-etoxicarbonilamino 10f.

Para obtener el anhídrido 3-cloro-1,8-naftálico 10g, se calentó 10a con pentacloruro de fósforo en tubo cerrado a 200 °C.

El anhídrido 3-tercbutil-1,8-naftálico 10h, se preparó a partir de acenafteno 11, que por tratamiento con cloruro de tercbutilo en las condiciones de una reacción de Friedel-Crafts, se transformó en el 4-tercbutilacenafteno, que por oxidación crómica dio lugar a 10h (13) (Esquema 2).

Para la síntesis de los anhídridos 4-sustituidos, se partió del acenafteno 11, que por nitración en medio acético proporcionó el 5-nitroderivado, cuya oxidación crómica suministró el anhídrido 4-nitro-1,8-naftálico 10i (14). La hidrogenación de éste en presencia de paladio originó el anhídrido 4-amino sustituido 10j (15).

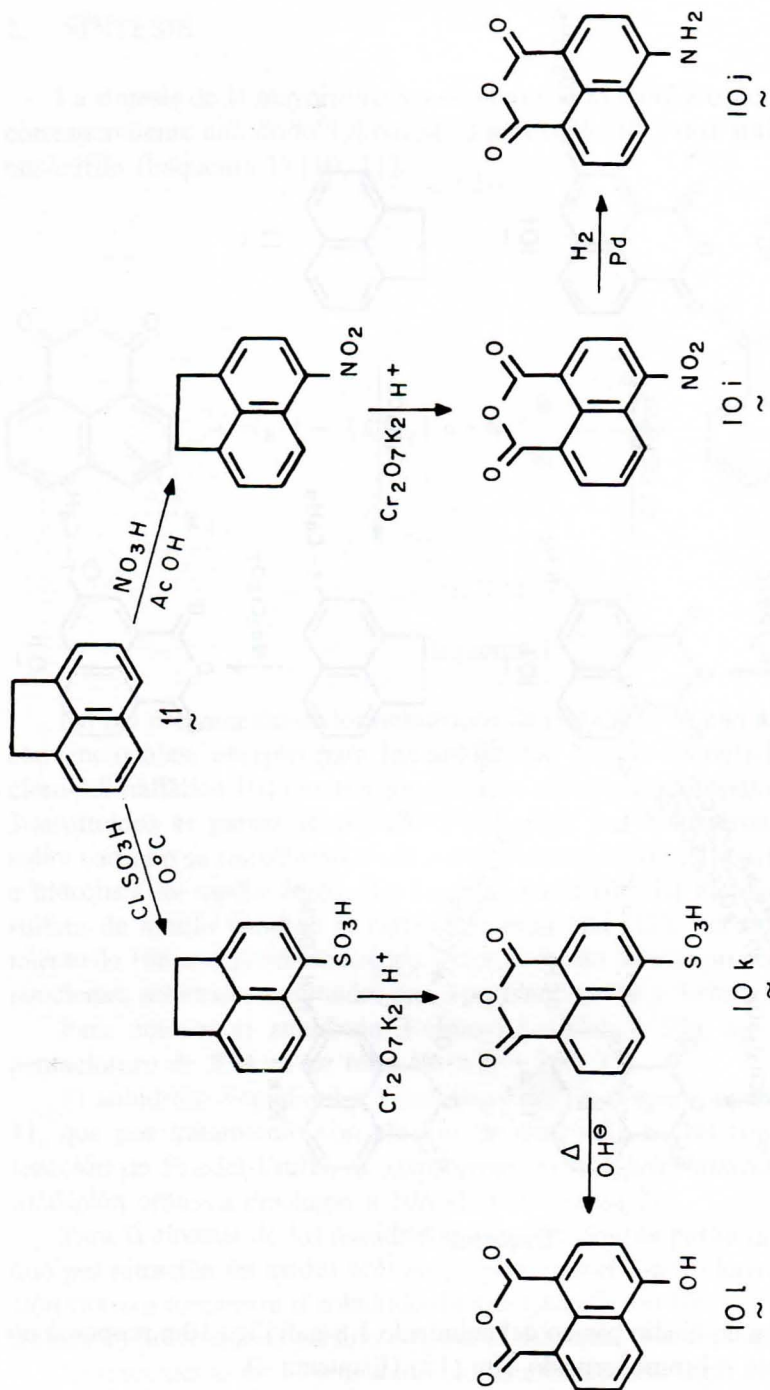
El tratamiento de 11 con ácido clorosulfónico, dio lugar al sulfonilderivado (16), cuya oxidación crómica condujo al anhídrido 10k, que por fusión alcalina se transformó en el derivado hidroxilado 10l (17) (Esquema 3).



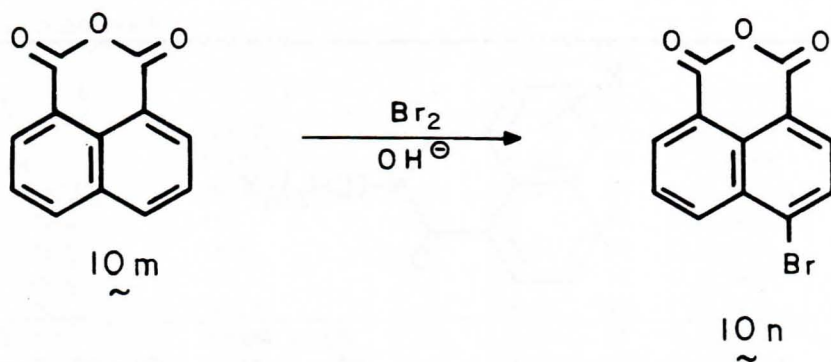
Esquema 2

La bromación en medio básico del anhídrido 1,8-naftálico 10m proporcionó el correspondiente 4-bromoderivado 10n (18) (Esquema 4).

La preparación del anhídrido 2-metoxi-1,8-naftálico 10p se realizó a partir del 2-metoxinaftaleno que por reacción con el dicloruro de difeniloxalimida



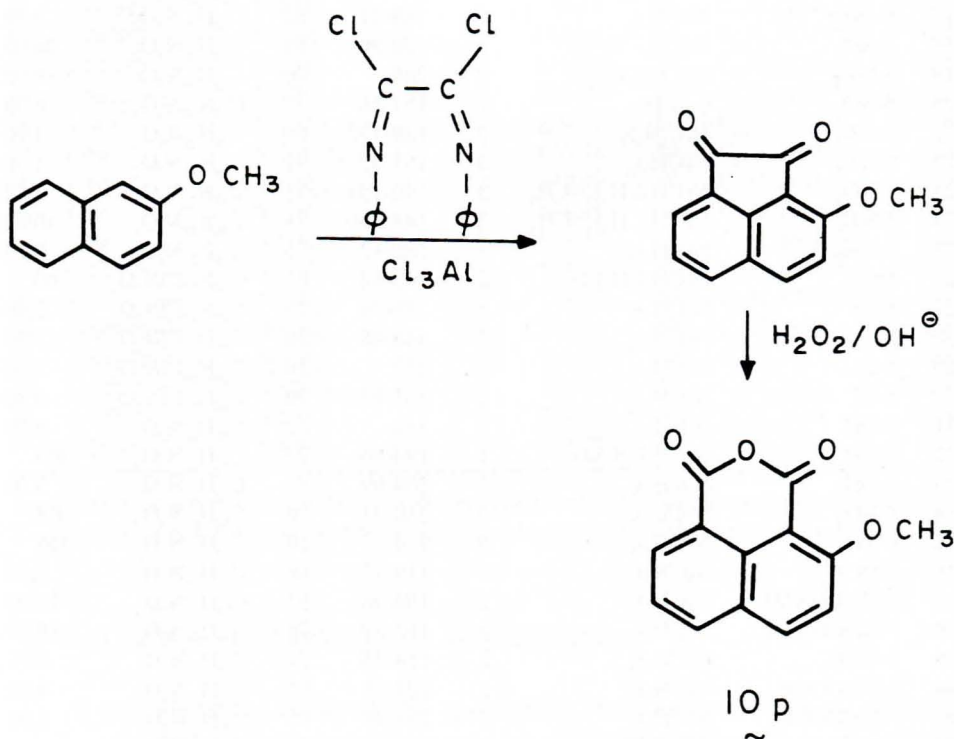
Esquema 3



Esquema 4

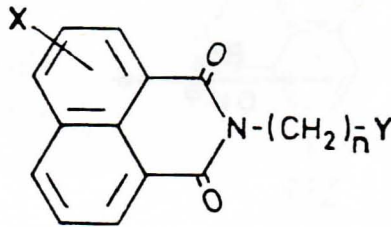
suministró la 3-metoxiacenaftenoquinona (19), que por oxidación con agua oxigenada dio lugar a 10p (20) (Esquema 5).

En la Tabla I se describen los benzo[d,e]isoquinolein-1,3-dionas así obtenidas con sus constantes físicas y su actividad citostática frente a células Hela expresada en forma de  $DI_{50}$  (21).



Esquema 5

Tabla I




Comp.	X	Y	n	P.f. (°C)	Rto. %	Fórmula	DI <sub>50</sub> (µg/ml)
5	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	138-39	64	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,15
6	5-NO <sub>2</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	2	120-21	64	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	3,00
7	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	145-46	58	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,70
8	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	2	136-37	57	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2,00
12	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	0	227-28	40	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	>100
13	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	1	174-76	20	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	35,00
14	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	99-100	84	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	1,00
15	5-NO <sub>2</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	3	105	89	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	5,00
16	5-NH <sub>2</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	3	132-33	81	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	25,00
17	5-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	169-71	82	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	2,50
18	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O	2	188-90	69	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	20,00
19	5-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O	2	288	76	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	10,00
20	5-NO <sub>2</sub>	 N-Et	0	157-58	37	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	6,00
21	5-NH <sub>2</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	2	120-122	84	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	3,00
22	5-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	195-97	79	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1,50
23	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>3</sub>	3	150-151	75	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	2,00
24	5-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>3</sub>	3	148-150	74	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	10,00
25	5-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	2	180-82	75	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	8,00
26	5-Cl	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O	2	143-44	67	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	100
27	5-Cl	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	75-76	25	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,00
28	5-Cl	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	146-48	20	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,50
29	5-Cl	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	2	137	20	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,50
30	5-Cl	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	161-63	20	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,80
31	5-OH	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	210	62	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,00
32	5-OH	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O	2	194-96	27	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	100
33	5-OH	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	208-09	81	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,50
34	5-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0	230-31	70	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	>100
35	5-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0	214	50	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	100
36	5-OCH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	115-17	68	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,50
37	5-NHCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	194-96	57	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10,00
38	5-NHCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	180-82	78	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10,00
39	5-OCH <sub>3</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	114-15	29	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,75
40	5-NHCOCH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	221-23	83	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	4,00
41	5-NHCOCH <sub>3</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	218-20	95	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	5,00
42	5-NO <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	141-42	72	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	>100
43	5-NO <sub>2</sub>	SH	2	190-92	50	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	>100



Tabla I (Continuación)

Comp.	X	Y	n	P.f. (°C)	Rto. %	Fórmula	DI <sub>50</sub> (µg/ml)
44	H	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	147	77	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,50
45	H	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	91-93	80	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,00
46	5-t-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	123-24	84	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14,00
47	5-NO <sub>2</sub>	OH	2	231	80	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	100
48	5-NO <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	2	149-51	60	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	100
49	5-NO <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	2	198-200	11	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,70
50	5-NO <sub>2</sub>	NHCH <sub>3</sub>	2	176-78	49	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,40
51	5-NO <sub>2</sub>	NHCOCH <sub>3</sub>	2	237-38	91	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	100
52	5-NHCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	2	175-76	55	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10,00
53	5-NHCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	3	158-59	57	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	8,00
54	5-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	3	81-83	90	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	5,00
55	5-OH	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	2	170-72	60	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,00
56	5-NHCOCH <sub>3</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	2	185-86	85	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	6,00
57	5-NHCOCH <sub>3</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	3	149-50	80	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	6,00
58	5-NO <sub>2</sub>	<sup>†</sup> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> <sup>†</sup> I	2	291-92	80	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> I	45,00
59	6-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	114-15	69	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2,00
60	6-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	130-31	59	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	3,00
61	6-OCH <sub>3</sub> <sup>1</sup>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	125-27	83	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,75
62	6-OCH <sub>3</sub> <sup>1</sup>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	79-81	86	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,50
63	6-OCH <sub>3</sub> <sup>1</sup>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	2	92-94	80	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4,00
64	6-OCH <sub>3</sub> <sup>1</sup>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	2	121-22	77	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4,50
65	6-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	230-32	81	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1,00
66	6-NH <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	220-22	80	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	2,00
67	6-NO <sub>2</sub>	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	2	126-28	59	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	5,50
68	6-NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	2	147-49	60	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	5,00
69	6-Br	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	144-46	74	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,00
70	6-Br	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	129-31	72	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,00
71	6-Cl	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	114-16	82	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,00
72	6-Cl	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	113-15	85	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7,00
73	6-NH-Bu <sup>n2</sup>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	104-06	59	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	4,00
74	6-NH-Bu <sup>n2</sup>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	169-71	55	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	4,00
75	6-OH	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	190-92	48	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	100,00
76	6-OH	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2	210-12	41	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	64,00
77	4-OCH <sub>3</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2	127-29	68	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,00

1.—Obtenido a partir del nitroderivado por reacción con CH<sub>3</sub>ONa en presencia de (AcO)<sub>2</sub>.

2.—Obtenido a partir del cloroderivado por reacción con n-Bu-NH<sub>2</sub> en presencia de (AcO)<sub>2</sub>Cu.

### 3. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Al considerar los valores DI<sub>50</sub> que figuran en la Tabla I, se puede observar que la actividad máxima aparece cuando los nitrógenos de la cadena en posición 2 están separados por dos metilenos. La presencia del átomo de nitrógeno básico

en ésta es esencial para la actividad citotóxica, ya que la sustitución de éste por otros heteroátomos como oxígeno o azufre (compuestos 43, 47 y 48), así como por un metino (compuesto 42) conduce a compuestos inactivos. La disminución de la basicidad del nitrógeno da lugar a productos menos activos, así la acetilación de 49 dio el producto 51, que es prácticamente inactivo. De igual forma, la cuaternización del nitrógeno (compuesto 58) disminuye fuertemente la actividad.

La introducción de un anillo de morfolina en la cadena (compuestos 18, 19, 26 y 32) disminuye la actividad, lo que parece deberse a la presencia del átomo de oxígeno en el ciclo, ya que los compuestos con el anillo de piperidina (8, 25 y 29) son activos.

La actividad también decrece al disminuir el número de metilos del nitrógeno terminal. Así, en los compuestos 5, 50 y 49 con 2, 1 y 0 metilos respectivamente se observa una caída gradual de la actividad. Esto parece indicar que en el receptor existe una zona ácida de Lewis, con la que interaccionaría el nitrógeno, sin que aparezcan fenómenos de solvatación. Este centro ácido debe presentar ciertas restricciones estéricas, ya que la actividad máxima se observa con los alquilos más pequeños (dos metilos o tetrametileno).

Respecto al sustituyente en el anillo naftalénico, se observa que generalmente la actividad máxima se corresponde con la sustitución en la posición 5 frente a la posición 6. Aunque sólo se ha preparado un compuesto 77 con el sustituyente en 4, éste es marcadamente menos activo que los sustituidos en las otras posiciones (compuestos 36 y 62). Estos resultados han sido confirmados recientemente en un trabajo de Zee-Cheng y col. (22).

Para la optimización de la serie, se llevó a cabo el estudio QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) para los compuestos sustituidos en la posición 5, debido a su ya comentada mayor actividad.

La aplicación del método de Free-Wilson (23) para todos los compuestos cuya dosis inhibitoria es inferior a 100, no conduce a resultados estadísticamente significativos, lo que parece señalar hacia la existencia de más de un mecanismo de acción o a efectos cuadráticos.

Para la utilización del modelo de Hansch-Fujita (24), se utilizaron los parámetros físico-químicos indicados en la Tabla II, despreciando también los productos cuya dosis inhibitoria es superior a 100 y aquellos cuya parametrización no ha sido posible. La matriz de correlación que se representa a continuación (Tabla III) se ha determinado a partir de los compuestos 5-8, 14-17, 21-25, 27-33, 36-41, 44-45 y 52-57. En la misma puede observarse que excepto para  $V_{WR}$  y  $\sigma^*$  que son colineales, el resto de los parámetros son aceptablemente ortogonales.

Sin embargo, la aplicación de este método empleando términos cuadráticos no proporciona resultados satisfactorios, por lo que cabe esperar mecanismos distintos de actuación.

Tabla II.—Parámetros físico-químicos.

Sustituyente	$(CH_2)_nY$			Sustituyente	X		
	$\pi^a$	$\sigma^{*b}$	$V_{w^c}$		$\pi^a$	$\sigma_m^d$	$V_{w^c}$
$(CH_2)_3N(CH_3)_2$	0,94	-0,605	61,92	H	0,000	0,00	2,52
$(CH_2)_3N(C_2H_5)_2$	2,02	-0,805	82,38	NO <sub>2</sub>	-0,067	0,71	16,80
$(CH_2)_2N(CH_3)_2$	0,86	-0,590	51,69	NH <sub>2</sub>	-1,297	-0,16	10,54
$(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	1,94	-0,790	72,15	Cl	0,893	0,37	12,00
$(CH_2)_2N(CH_2)_4$	1,61	-0,765	64,13	OH	-0,447	0,12	8,04
$(CH_2)_3N(CH_2CH_2)_2NCH_3$	1,25	-1,340	92,36	OCH <sub>3</sub>	0,197	0,12	16,87
$(CH_2)_2N(CH_2)_5$	2,18	-0,780	74,36	NHCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-0,087	0,07	47,82
				NHCOCH <sub>3</sub>	-0,507	0,21	33,89

(a) Calculados usando constantes fragmentarias (25) (26).

(b) (27).

(c) Calculadas usando contribuciones estéricas de Van der Waals (28).

(d) (29).

Tabla III.—Matriz de correlación.

	$pDI_{50}$	$V_{wX}$	$V_{wR}$	$\sigma_R^*$	$\sigma_m$	$\pi_X$	$\pi_R$	$V_{wX}^2$	I-2	I-3
$pDI_{50}$	1	-0,407	-0,428	0,260	-0,064	0,413	0,400	-0,460	0,370	0,598
		2,399 <sup>a</sup>	2,550 <sup>a</sup>	1,453 <sup>a</sup>	0,345 <sup>a</sup>	2,442 <sup>a</sup>	2,350 <sup>a</sup>	2,790 <sup>a</sup>	2,145	4,018 <sup>a</sup>
		97 <sup>b</sup>	98 <sup>b</sup>	80 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	95 <sup>b</sup>	95 <sup>b</sup>	99 <sup>b</sup>	95 <sup>b</sup>	99,9 <sup>b</sup>
$V_{wX}$		1	0,077	0,027	-0,005	0,058	0,144	0,977	0,087	-0,080
$V_{wR}$			1	-0,843	0,055	-0,243	-0,202	0,043	-0,773	-0,290
$\sigma_R^*$				1	-0,012	0,250	-0,355	0,047	0,462	0,172
$\sigma_m$					1	0,566	-0,019	-0,121	-0,166	0,236
$\pi_X$						1	-0,165	0,051	0,126	0,184
$\pi_R$							1	0,125	-0,563	0,210
$V_{wX}^2$								1	-0,105	0,149
I-2									1	0,373
I-3										1

(a) Test de Student.

(b) Grado de significación (%).

Cuando se representa la actividad biológica molar frente al volumen de Van der Waals (Fig. 1), se observa una dependencia parabólica. Por esta razón podemos asumir que la existencia de un volumen máximo del sustituyente en la posición considerada, la cinco, correspondiente a un  $V_{wR}=17$  cc/mol, da lugar a la máxima actividad inhibitoria. Pero una dependencia parabólica del volumen del sustituyente no parece tener un sentido físico claro, siendo ésta la razón por la que se consideró la existencia de dos mecanismos de acción diferentes, lo cual no parece estar de acuerdo con la realidad, ya que como se expone posteriormente, los compuestos de esta serie actúan como intercalantes especí-

ficos del par G-C del ADN, por lo que cabe esperar un único mecanismo de acción.

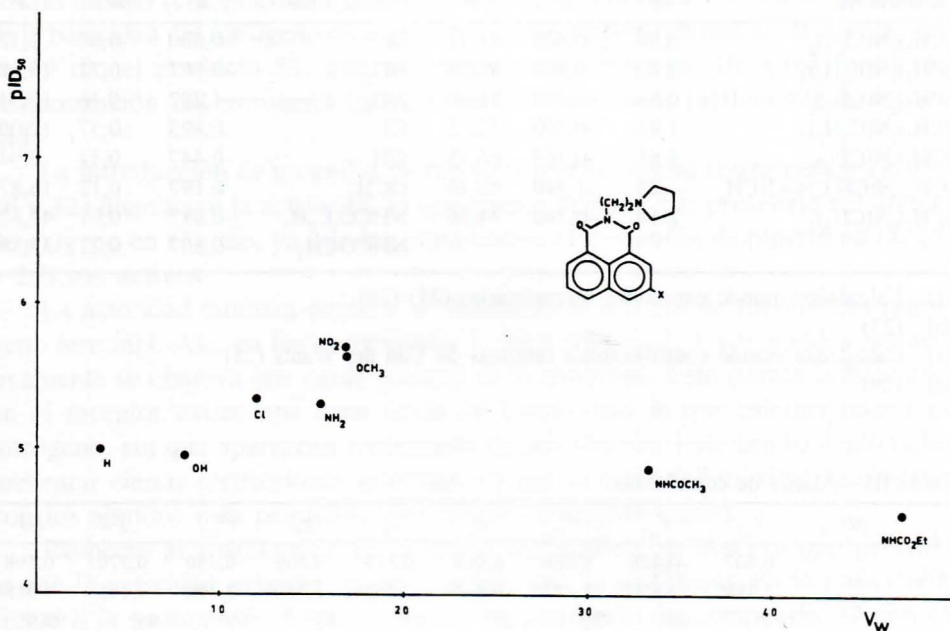


Figura 1

Sin embargo, sí puede explicarse la hipótesis del “doble mecanismo de acción” si se tiene en cuenta la naturaleza de los dos sustituyentes con  $V_{wX} > 17$  cc/mol. Ambas funciones pueden actuar como precursores del grupo amino, por lo que al haber sido medida “in vitro” la actividad de los derivados 5-acetilamino y 5-etoxicarbonilamino, ésta va a venir determinada por la capacidad metabólica de la propia célula tumoral del cultivo. Es decir, los compuestos con estos grupos funcionales actuarían como “pro drug”, del compuesto 17.

La ecuación siguiente representa la relación existente entre la actividad de los compuestos con  $V_{wX} < 17$  cc/mol y los distintos parámetros fisicoquímicos (11).

$$pDI_{50} = 0,029 V_{wX} - 0,055 V_{wR} - 1,979 \sigma^* + 0,487 \sigma_X + 0,029 \Pi_X + 0,146 \Pi_R + 6,663$$

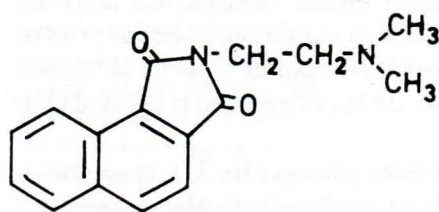
$$n = 23; r = 0,90; s = 0,19; F = 10,67$$

Esta ecuación tiene carácter predictivo ya que para los compuestos 54 y 55, no utilizados en el análisis, los resultados obtenidos coinciden plenamente con los encontrados:

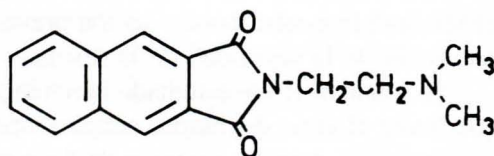
	$pDI_{50}$ cal.	$pDI_{50}$ enc.
Comp. 54	4,77	4,78
Comp. 55	4,80	4,80

A partir de esta ecuación, se determina que el compuesto óptimo de todos los posibles es 5, lo que confirma la bondad del procedimiento utilizado en el diseño. A este compuesto la O. M. S. le ha asignado el nombre de Mitonafide (30).

Por otra parte, se han preparado los compuestos 78 y 79 para conocer la influencia tanto del tamaño del anillo como de la posición del grupo imida, habiéndose encontrado que ninguno de los dos compuestos es activo (31).



78



79

En un trabajo reciente (32), Narayanan y col. del National Cancer Institute (USA), han realizado el estudio de la relación estructura-actividad "in vivo", empleando como método de determinación de la actividad antitumoral las técnicas habituales de la leucemia linfocítica P 388 y la leucemia linfocítica L 1210. El método matemático utilizado para la optimización de esta serie de compuestos, incluyendo algunas estructuras homólogas, es el basado en la teoría de conjuntos descrito por Austel (33). Los resultados obtenidos demuestran que el compuesto más activo en estas técnicas es la 5-amino-2-(2-dimetilminoetil)-benzo [d,e] isoquinolein-1,3 -diona ( $X = 5-NH_2$ ,  $n = 2$ ,  $R = R' = CH_3$ ), compuesto 17 de la Tabla I.

Este fármaco, con el número de serie NSC 308847 ha sido seleccionado para estudios clínicos en USA, debido a su elevada actividad en las leucemias P 388 (T/C 177, 176) y L 1210 (T/C 197, 175). En otros estudios adicionales (32) se ha encontrado que también es activo sobre el melanoma B16 (T/C 155, 139) y en el carcinoma de Colon C872 (T/C 17, 26). El nombre asignado por la OMS a este compuesto es el de Amonafide (34).

## 4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 4.1. *Actividad antivírica*

En el año 1979, García-Gancedo y col. (35), describieron el primer estudio sobre la acción antiviral del Mitonafide “in vitro” e “in vivo”, utilizando como patrón comparativo la yododesoxiuridina (IDU). Los virus empleados fueron los del herpes simplex y de la vacuna (ADN) y los de la influenza y el Sindbis (ARN). Los resultados obtenidos, muestran que este producto es más tóxico que el IDU, presentando sobre el herpes, a una dilución de 1 µg/ml, un efecto similar al del patrón a una dosis de este último 100 veces superior. El mismo resultado, en cuanto a la inhibición, se obtuvo con el virus de la vacuna. Sin embargo, frente a los virus ARN no se observó ningún efecto virucida. La actividad inhibitoria está relacionada con el tiempo de adición del fármaco. En las pruebas de la infección dérmica u ocular del conejo producida por el virus de la vacuna, el Mitonafide mostró poseer acción preventiva de la enfermedad o capacidad de reducción de la severidad de la misma.

El Amonafide fue estudiado también por estos autores (36, 37), encontrando que frente al virus del herpes simplex tipo 2, cultivado sobre células Vero, a la concentración máxima tolerada de 4 µg/ml, produce una reducción de 5 unidades logarítmicas del título del virus, siendo del orden de una unidad logarítmica más activo que el IDU. A esta concentración, el fármaco posee actividad virucida sobre el herpes, pero no muestra ninguna actividad sobre el adenovirus tipo 5.

Sobre el herpes simplex tipo 1, a la misma concentración y en idénticas condiciones, se encontró una inhibición del virus de unos tres órdenes de magnitud. Frente al virus de la vacuna, la reducción es de un orden de magnitud y frente al de la fiebre porcina africana la actividad es muy baja, ya que es menor de un orden de magnitud.

Cuando estos fármacos se eliminaron del medio de cultivo, se reinició la síntesis del virus, lo que indica que el daño producido sobre éstos no es permanente, lo cual está de acuerdo con la reversibilidad de la acción al no formar enlaces covalentes con el ADN. Por otra parte, los pases sucesivos de ambos fármacos dan lugar a la aparición de resistencias.

Es importante destacar que la actividad del Amonafide sobre el virus del herpes simplex tipo 2, es mayor que sobre la del tipo 1, lo que contrasta con otros inhibidores del herpes como el (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina.

### 4.2. *Actividad antibiótica*

La determinación (38) de la actividad antibiótica del Mitonafide, se ha realizado mediante la valoración de la concentración mínima inhibitoria de Chabbert (39). El

Mitonafide, en forma de acetato, se aplicó al medio de cultivo de Müller-Hinton comercial. El inóculo se hizo en fase estacionaria, haciendo diluciones de  $10^5$ - $10^6$  gérmenes por mililitros. En la Tabla IV se indican los resultados obtenidos.

Tabla IV.—Concentración mínima inhibitoria de Mitonafide.

<i>Microorganismos</i>	<i>CMI µg/ml</i>
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10.240 .....	20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6.538 .....	20
<i>Staphylococcus pyogenes</i> M.....	40
<i>Sarcina Lútea</i> ATCC 9.341 .....	20
<i>Pseudomona aeruginosa</i> M-2 .....	333
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 7.700 .....	200
<i>Pasteurella aviséptica</i> M-9 .....	200
<i>Pasteurella aviar</i> M (69) .....	100
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13.315 .....	20
<i>Enterobacter aerógenes</i> ATCC 13.048 .....	40
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9.799 .....	10
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11.778 .....	40
<i>Serratia marcescens</i> M-49 .....	71
<i>Serratia marcescens</i> M-50 .....	40
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ATCC 13.812 .....	20
<i>Neisseria catharralis</i> ATCC 8.176 .....	20
<i>Salmonela paratyphi</i> ATC 11.511 .....	40
<i>Salmonela Typhi</i> ATTC 19.430 .....	10
<i>Escherichia coli</i> M.....	20
<i>Escherichia coli</i> M (104) .....	20
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13.313 .....	10
<i>Diplococcus pneumoniae</i> ATCC 6.332 .....	20
<i>Hemophilus influenzae</i> ATCC 19.418 .....	20
<i>Klebsiella penumoniae</i> ATCC 9.997 .....	40

Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias muestran que el Mitonafide se comporta, al menos en parte, como un antibiótico de amplio espectro. Esta actividad, si bien no tiene interés terapéutico debido a su toxicidad, puede ser interesante como preventivo de las infecciones intercurrentes en enfermos cancerosos.

#### 4.3. *Actividad antiparasitaria*

La actividad antiparasitaria del Mitonafide y del Amonafide, se ha estudiado frente al *Tripanosoma Cruzi*, protozoo responsable de la Enfermedad de Chagas, una de las afecciones más extendidas y peligrosas del continente americano y para la que no existe tratamiento adecuado.

Los resultados obtenidos (40) demuestran que el Mitonafide es activo "in

vitro" frente a este parásito, observándose inhibición del crecimiento a partir de 0,08  $\mu\text{g/ml}$ . Este efecto es irreversible y algunos de los parásitos presentan movilidad, por lo que puede deducirse que el fármaco no tiene acción tripanolítica.

El hecho de que al cabo de 108 horas aparezcan todavía epimastigotes, parece *indicar que el producto actúa únicamente como inhibidor de la fase de reproducción, bloqueando la síntesis del ADN.*

En preparaciones teñidas con Giemsa, aparecen alteraciones nucleares, condensación cromática irregular y zonas claras dentro del núcleo. Los estudios comparativos con elipticina demostraron que Mitonafide es más eficaz.

Con el deseo de profundizar en el conocimiento de estas alteraciones, se realizó un estudio (41) mediante microscopía electrónica del parásito tratado con Amonafide, habiendo encontrado que el núcleo, por lo general, presenta la cromatina dispuesta laxamente, no apreciándose alteraciones en el endosoma. El citoplasma contiene acúmulos de vacuolas autofágicas y gotas lipídicas en número excesivo con respecto a los controles. En algunas formas, las alteraciones en el cinetoplasto llegan a presentar su ADN sin su estructura típica de doble hélice, mostrando estructuras arqueadas y un aspecto altamente electrodenso, fenómeno no observado en los controles.

Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Bernard y Riou (42) y Delain y Riou (43) en el tratamiento de los flagelados con elipticina o bromuro de etidio y daunomicina, respectivamente, fármacos de acción intercalante reconocida, por lo que se confirma la forma de conjugación al ADN de las benzo[de]-iso-quinolein-1,3-dionas.

Los estudios "in vivo" (44), mostraron una disminución inicial de las tasas de mortalidad de los animales tratados con respecto a los controles. Los síndromes colaterales de la enfermedad desaparecieron quizás como consecuencia del efecto inmunosupresor de estos agentes antitumorales. La administración de los fármacos previamente acomplejados con ADN, produjo una disminución de la actividad antiparasitaria, pese a que en estas condiciones los productos presentan menos toxicidad para los animales tratados.

#### 4.4. Actividad antitumoral

Los estudios preliminares sobre la actividad anticancerosa, del Mitonafide y del Amonafide, se realizaron (45) con los siguientes tumores experimentales: carcinoma ascítico de Erlich, carcinoma sólido de Erlich S. C. y sarcoma 37 en el ratón, así como hepatoma N-13 y carcinoma de Walker en rata.

Ambos fármacos mostraron acción sobre el ritmo mitótico. Así, a dosis de 4 mg/kg para el Mitonafide y 40 mg/kg para el Amonafide, se reduce el número de metafases, telofases y anafases durante un período de 8 horas, volviendo paulatinamente a los valores controles a las 12, 24 y 36 horas.



Respecto al crecimiento tumoral, el Mitonafide presentó actividad en el carcinoma subcutáneo de Erlich, carcinoma de Walker y sarcoma 37 a dosis de 6 mg/kg, vía i-p, mientras que no presentó ninguna acción sobre el hepatoma N-13. A dosis más altas, entre 10 y 40 mg/kg, el Amonafide presentó un espectro de actividad paralelo, siendo también inactivo en el hepatoma N-13. Los índices de actividad obtenidos con el Amonafide fueron superiores a los del Mitonafide.

Posteriormente, estos resultados fueron ampliados por el National Cancer Institute de los EE. UU. (46). Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas V y VI.

### *Evaluación*

1.—Sistemas de supervivencia al trasplante tumoral. Evaluación en base a la supervivencia (media o mediana). En general es necesario un mínimo incremento de la supervivencia de los animales tratados sobre los controles que resulte en un índice T/C  $\geq 125\%$  (índice T/C = supervivencia de los tratados/supervivencia de los controles  $\times 100$ ) y que este hallazgo sea confirmado en un segundo experimento, para considerar "actividad mínima reproducible". Son excepciones el carcinoma de pulmón de Lewis: T/C  $\geq 140\%$  y la leucemia P388: T/C  $\geq 120\%$ .

2.—Sistemas de inhibición tumoral: Evaluación en base a la inhibición tumoral (cambio del peso medio tumoral, cambio del diámetro tumoral, cambio del peso estimado a partir del diámetro).

En general es necesaria una inhibición del tumor reproducible mínima en los animales tratados sobre los controles que resulte en un índice T/C  $\geq 42\%$  (índice T/C = parámetro de inhibición tumoral considerado en los tratados/parámetro de inhibición tumoral considerado en los controles  $\times 100$ ).

3.—Se considera que la actividad es sustancialmente mayor que la mínima cuando en la evaluación de la supervivencia se encuentra un índice T/C  $> 150$  (excepción: leucemia P388 T/C  $> 175$ ) o en la evaluación de la inhibición tumoral un índice T/C  $\geq 10$ . La presentación de actividad sustancialmente mayor que la mínima es objeto de estudio por un comité con el objeto de aceptar el fármaco como candidato para el desarrollo de ensayos clínicos.

#### *4.5. Actividad farmacológica*

En las pruebas básicas de selección (47) se encontró que el Mitonafide no modifica el efecto de la serotonina y occitocina sobre el útero de rata a concentraciones menores de  $10^{-4}$  M. En ileón de rata o cobayo son necesarias dosis de  $10^{-5}$  M o superiores para modificar la respuesta a acetilcolina, histamina y  $C1_2Ba$ . En conducto deferente de rata el Mitonafide aumenta el efecto máximo

Tabla V.—Mitonafide: Influencia sobre la supervivencia y desarrollo tumoral en ratones con tumores humanos y murinos transplantados.

<i>Grupo huésped</i>	<i>Tumor</i>	<i>Parámetro</i>	<i>Sitio de inoculación</i>	<i>Ensayos procesados</i>	<i>Evaluación</i>
Ratón	Melanocarcinoma B16	Tiempo de supervivencia mediana	Intraperitoneal	10	Actividad mínima reproducible
Ratón	Tumor mamario CD8F <sub>1</sub>	Cambio en el peso tumoral medio	Subcutáneo	5	Actividad
Ratón	Xenoinjerto de colon CX-1	Cambio en el diámetro tumoral medio	Intrarrenal o cápsula subrenal	4	Actividad
Ratón	Colon 38	Peso tumoral medio estimado a partir del diámetro tumoral medio	Subcutáneo	11	Actividad
Ratón	Leucemia linfoide L-1210	Tiempo de supervivencia medio	Intraperitoneal	22	Actividad
Ratón	Leucemia linfoide L-1210	Tiempo de supervivencia mediana	Intraperitoneal	11	Actividad mínima reproducible
Ratón	Xenoinjerto de pulmón LX-1	Cambio en el diámetro tumoral medio	Intrarrenal o cápsula subrenal	4	Actividad
Ratón	Carcinoma de pulmón de Lewis	Tiempo de supervivencia mediana	Intravenoso	12	Actividad
Ratón	Xenoinjerto de mama MX-1	Cambio en el diámetro tumoral medio	Intrarrenal o cápsula subrenal	4	Actividad
Ratón	Leucemia linfocítica P388	Tiempo de supervivencia mediana	Intraperitoneal	25	Actividad mínima reproducible

Tabla VI.—Mitonafide: Influencia sobre la supervivencia y desarrollo tumoral en ratones con tumores humanos y murinos transplantados.

<i>Grupos</i>	<i>Tumor</i>	<i>Parámetro</i>	<i>Sitio de inoculación</i>	<i>Ensayos procesados</i>	<i>Evaluación</i>
Ratón	Melanocarcinoma B16	Tiempo de supervivencia mediana	Intraperitoneal	28	Actividad mínima reproducible
Ratón	Tumor mamario CD8F <sub>1</sub>	Cambio en el peso tumoral medio	Subcutáneo	15	Actividad
Ratón	Xenoinjerto de colon CX-1	Cambio en el diámetro tumoral medio	Intrarrenal o cápsula subrenal	4	Actividad
Ratón	Colon 38	Peso tumoral medio estimado a partir del diámetro tumoral medio	Subcutáneo	25	Actividad mínima reproducida
Ratón	Leucemia linfoide L-1210	Tiempo de supervivencia mediana	Intraperitoneal	12	Actividad sustancialmente mayor que la mínima
Ratón	Leucemia linfoide L-1210	Tiempo de supervivencia mediana	Intraperitoneal	21	Actividad sustancialmente mayor que la mínima
Ratón	Leucemia linfoide L-1210	Tiempo de supervivencia medio	Subcutáneo	16	Actividad sustancialmente mayor que la mínima
Ratón	Xenoinjerto de pulmón LX-1	Cambio en el diámetro tumoral medio	Intrarrenal o cápsula subrenal	4	Actividad
Ratón	Carcinoma de pulmón de Lewis	Tiempo de supervivencia medio	Intravenoso	12	Actividad
Ratón	Xenoinjerto de mama MX-1	Cambio en el diámetro tumoral medio	Intrarrenal o cápsula subrenal	4	Actividad
Ratón	Leucemia linfocítica P388	Tiempo de supervivencia mediana	Intraperitoneal	9	Actividad mínima reproducible

de la norepinefrina sin modificar el  $pO_2$ , tanto en preparaciones normales como previamente reserpinizadas. Sobre la aurícula aislada de cobayo tiene efecto cromotropo negativo.

En el estudio del esquema de Irwin, actividad exploratoria y actividad motora indican que a dosis bajas el Mitonafide puede producir excitación del SNC, mientras que dosis superiores a 1 mg/kg tienen carácter depresor. El Mitonafide presenta acción proconvulsivante frente a la estircina, y en menor grado frente al cardiazol.

El Mitonafide muestra un ligero efecto presor "per se" en la rata anestesiada, ~~reduce la respuesta presora a la quinidina y se opone al efecto hipotensor del isoproterenol.~~

El fármaco de prueba no mostró actividad en las analgesias mecánica y térmica, pero sí en la analgesia química con ácido acético. En los estudios de acción antiinflamatoria el Mitonafide fue inactivo frente al edema provocado por carragenina y ovoalbúmina. Tampoco mostró eficacia en la úlcera provocada por inmovilización más frío.

En las jaulas de metabolismo el Mitonafide produjo un efecto anorexígeno acompañado de pérdida de peso. Debido a que los animales manifestaron simultáneamente alteraciones de la frecuencia y consistencia de las deposiciones, el efecto anorexígeno se debe considerar fundamentalmente de origen tóxico. El Mitonafide no presenta toxicidad de grupo.

Dado el discreto carácter estimulante del Mitonafide, se estudió su influencia sobre el SNC, mediante el empleo de dos test de valoración de antidepresivos: modificación de la hipnosis inducida por barbitúricos y modificación de la ptosis palpebral inducida por el confinamiento, sin posibilidad de escape, en un medio adverso. También ha sido estudiada la influencia de la administración de Mitonafide sobre los niveles de NA, DA y 5-HT y los metabolitos HVA y 5-HIAA en las siguientes áreas cerebrales de la rata: Hipotálamo, estriado, amígdala y bulbo-puente. Los resultados obtenidos indican que el Mitonafide disminuye y reduce la duración de la inmovilidad en el test de Porsolt, no siendo activo frente a la ptosis palpebral inducida por tetrabenazina. Dicho fármaco modifica los niveles de NA, DA y 5-HT en el hipotálamo, y los niveles de 5-HT, HVA y 5-HIAA en el bulbo-puente, región donde se produce un aumento del "turnover" de 5-HT. Estos resultados son compatibles con una acción psicótropa de tipo estimulante.

#### 4.6. Toxicidad

La toxicidad aguda de Mitonafide expresada como dosis letal cincuenta (48) fue determinada en ratón, rata y perro (47) por vía ip. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla VII.

Tabla VII.—Toxicidad aguda del Mitonafide.

<i>Especie</i>	<i>Sexo</i>	<i>DL<sub>50</sub> (mg/kg)</i>
ratón	♂	15,1 (16,5-13,8)
	⊕	15,2 (16,0-14,4)
rata	♂	15,1 (16,4-13,9)
	⊕	15,5 (16,8-14,3)
perro	♂ y ⊕	8,5 (9,5-7,6)

Los síntomas de toxicidad fueron anorexia, vómitos, cambio de color y consistencia de las heces, disminución de la actividad motora y pérdida de peso. Los principales hallazgos a dosis tóxicas fueron ulceraciones de la mucosa gastrointestinal, con hemorragias locales recientes, hipoplasia de la médula, congestión esplénica, hepática y pulmonar, con hemorragias de extensión variable y necrosis hepática focal centrolobulillar.

La toxicidad subaguda en perros, abordada por las vías p.o e i.v mostró la absorción del producto por vía oral, confirmando los signos de toxicidad observados en los estudios agudos y/o los nuevos como son la contracción abdominal, temblores, andar inseguro, piloerección y postración. Los análisis hematológicos mostraron un descenso acusado en el recuento de hematíes y leucocitos, así como en el hematocrito, mientras que la velocidad de sedimentación globular se elevó enormemente. Los análisis bioquímicos mostraron elevación de la fosfatasa ácida y de las transaminasas. Las autopsias mostraron queratitis, úlceras corneales e inflamación de la mucosa del ojo, boca y ano. Se observó una coagulación deficiente de la sangre; el estómago e intestino vacíos ligeramente congestionados; hepatomegalia y en las dosis superiores, hígado de color achocolatado. Pericarditis con líquido en pericardio en dos animales y endocarditis en otros dos. Ligeró edema de pulmón. Riñón inflamado que se descapsula mal, hemorragias y edemas cerebrales y vejigas con poco contenido y coloreado.

La toxicidad del Amonafide (49), se determinó por vía i.v en ratones, ratas y perros, en dosis únicas o en cinco dosis en días sucesivos. En la Tabla VIII se indican los valores encontrados para la toxicidad en ratones. Los signos de toxicidad más característicos que aparecen en el ratón son: respiración trabajosa y forzada, pérdida de control locomotor, hiperextensión de las extremidades, aumento de la irritabilidad, ataxia, deshidratación, disminución del peso corporal, postración y muerte.

Tabla VIII.—Toxicidad aguda del Amonafide en ratones.

	<i>Dosis única</i>	<i>5 Dosis sucesivas</i>
DL <sub>90</sub> (mg/m <sup>2</sup> )	236	98
DL <sub>50</sub> (mg/m <sup>2</sup> )	207	85
DL <sub>10</sub> (mg/m <sup>2</sup> )	182	75

Las dosis utilizadas en perros fueron de 18,4, 9,2 y 0,92 mg/kg en dosis *únicas* y 11,4, 3,8 y 0,38 mg/kg en dosis diaria repetida durante cinco días. La *reacción inmediata en perros fue aumento de tensión muscular, resistencia al movimiento, sonidos vocales, salivación excesiva, respiración trabajosa, hiperextensión de extremidades y tembor muscular*, que fueron seguidos por ladridos, postura defensiva y orina rojiza.

Las características tóxicas en las ratas fueron: diarreas, consumición, *lesiones de colon, deshidratación, postura combada, andar anormal, coma y muerte*.

#### 4.7. Ensayos clínicos

Actualmente se han iniciado los ensayos clínicos con Mitonafide y aunque aún es pronto para presentar resultados sobre su eficacia antitumoral se puede adelantar que la dosis terapéutica estará próxima a los 7,5 mg/kg y que la tolerancia objetiva y subjetiva es muy superior a la presentada por otros antitumorales utilizados actualmente en clínica.

### 5. MECANISMO DE ACCIÓN

Las benzo[de]isoquinolein-1,3-dionas sustituidas de fórmula general 9, se unen por intercalación al ADN bihelicoidal. Waring ha encontrado (50) que para un pH = 7 y para una fuerza iónica de 0,01 mol/l de sal, las constantes de asociación intrínseca para el Mitonafide son de  $\log K = 5,16$ , ocluyendo cada molécula unida al ligando 3,4 nucleótidos (1,7 pares de bases) de la malla del ADN. Este compuesto suprime e invierte la superespiral del ADN MP2 dúplex cíclico con un ángulo aparente de desenrollamiento de  $11^\circ$  por molécula de fármaco conjugada, en relación con un ángulo de  $26^\circ$  calculado para el etidio.

El Mitonafide produce un incremento en la longitud de los fragmentos variformes sonicados del ADN que se calcula en 2,2-2,5 Å .

Kearns (51), mediante la utilización de RMN protónica de alta resolución, ha encontrado que Mitonafide posee una cinética lenta de intercalación, produciendo un marcado desplazamiento a campos más altos ( $\sim 1,7$  ppm) de los protones imínicos que forman los enlaces de hidrógeno de los pares de bases del modelo de Watson y Crick. Los resultados obtenidos demuestran que se compleja al par guanina-citosina con una marcada especificidad. La cinética lenta de intercambio es un resultado sorprendente si se tiene en cuenta el tamaño relativamente pequeño del cromóforo, que además está exento de carga, lo que no es frecuente en los compuestos intercalantes. Esta cinética lenta, unida a la gran afinidad que presenta por conjugarse con el ADN, explica la gran actividad antitumoral de esta sustancia. Esta conjugación intensa al ADN puede explicarse

(52) mediante su capacidad como aceptor para la formación de complejos de transferencia de carga con las bases, ya que el cromóforo del Mitonafide presenta una gran deficiencia electrónica. De hecho, la molécula en sí se encuentra formando este tipo de complejo, de forma interna, con el par de electrones no enlazantes del nitrógeno, lo que evidencia la propiedad de que la base libre sea amarilla, mientras que las sales sean incoloras.

Sin embargo, este argumento parece estar en contradicción con el hecho de que el Amonafide presente un índice terapéutico superior al Mitonafide en algunos de los tumores experimentales. Aunque no se han realizado estudios concretos sobre el mecanismo de acción del Amonafide, sí se han llevado a cabo por el grupo de Wilson (53), con el homólogo superior con tres metilenos en la cadena lateral, habiéndose considerado también la influencia del sustituyente en las posiciones 5 y 6 del cromóforo. Estos autores confirman de nuevo que las benzo[de]isoquinolein-1,3-dionas sustituidas en la posición 6, poseen menos actividad que las sustituidas en la posición 5. Así el 6-nitro derivado, se conjuga al ADN con aproximadamente la tercera parte de intensidad con la que se conjuga el compuesto 5-sustituido, postulando que esta diferencia se debe al ángulo que forma el nitro en 6 con el cromóforo, mientras que el nitro en 5 puede adoptar una conformación coplanar con el mismo. Esta coplanaridad permite una integración más favorable con el par de bases G-C y, por consiguiente, una conjugación más fuerte al ADN. Las constantes de conjugación de las benzo[de]isoquinolein-1,3-dionas sustituidas en 5 por hidrógeno, amino y nitro siguen el orden nitro > amino > H, lo que indica que la constante de Hammett del sustituyente no influye en la capacidad de conjugación. Por otra parte, por determinación de la curva de desnaturalización térmica del ADN, se obtiene el parámetro  $T_m$ , temperatura a la que se produce un cambio en la absorción del ADN que indica que se ha alcanzado el 50% de la transición térmica. El orden encontrado para  $T_m$  es  $\text{NO}_2 > \text{H} > \text{NH}_2$ , lo que sugiere una diferencia significativa en la contribución del sustituyente sobre la entalpía de conjugación. Estos resultados se confirman al determinar las entalpías de conjugación mediante la representación del Van't Hoff, indicando que tanto la entalpía como la entropía contribuyen significativamente a la conjugación del compuesto con nitro e hidrógeno, mientras que la conjugación del amino derivado es un proceso fundamentalmente entálpico. Mediante la utilización de modelos moleculares CPK se puede concluir que cuando se forma el complejo de intercalación, el grupo amino en 5 puede formar enlaces de hidrógeno con el oxígeno 5'-diéster del esqueleto azúcar-fosfato del ADN, lo que favorece la unión desde el punto de vista energético, aunque con una pérdida de movilidad o disponibilidad de la conformación necesaria para la conjugación. En definitiva, el balance entalpía-entropía resulta favorable para la energía libre de conjugación del 5-amino derivado.

En conclusión, si bien la presencia del grupo amino en cinco, parece

dificultar la formación del complejo de conjugación con el ADN por el hecho de que es un grupo capaz de ceder electrones al cromóforo y así dar lugar a complejos de transferencia de carga menos fuertes, esta menor intensidad en la unión se ve compensada por la capacidad de unión del grupo amino a la cadena azúcar-fosfato, mediante la formación de enlaces de hidrógeno, o por reacción ácido-base que en principio parece no descartable, ya que el compuesto 5 hidroxisustituido puede formar enlaces de hidrógeno más intensos y sin embargo es mucho menos activo (46).

## 6. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

En un trabajo reciente, González y col. (54) han descrito los diversos aspectos farmacocinéticos del Mitonafide, que serán considerados brevemente a continuación.

### 6.1. Unión a proteínas plasmáticas

Se ha estudiado la unión del Mitonafide a seroalbúmina humana "in vitro" mediante la técnica de filtración molecular (55), habiendo valorado el principio activo por espectrofotometría UV, a la longitud de onda de 339 nm.

Los resultados se recogen en las Tablas IX y X y en la Figura 2. Como puede comprobarse, aparece un porcentaje de unión muy elevado, del orden del 95%, a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Existen dos clases de puntos de unión; uno de ellos consta de  $N_1 = 0,1$  puntos de unión por mol de proteína, con una constante de afinidad alta  $K_1 = 9,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , y el otro tiene  $N_2 = 0,7$  puntos de unión por mol de proteína con una constante de afinidad más baja  $K_2 = 4,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

Tabla IX.—Concentraciones del Mitonafide ensayadas y unión a la seroalbúmina humana.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	% de unión	ESM
10	95.33	1.15
15	91.00	1.40
20	78.25	3.14
23	66.65	1.00
25	64.96	0.84
30	61.08	0.60
50	61.10	1.51

ESM = Error estándar medio de seis medidas para cada concentración ensayada.



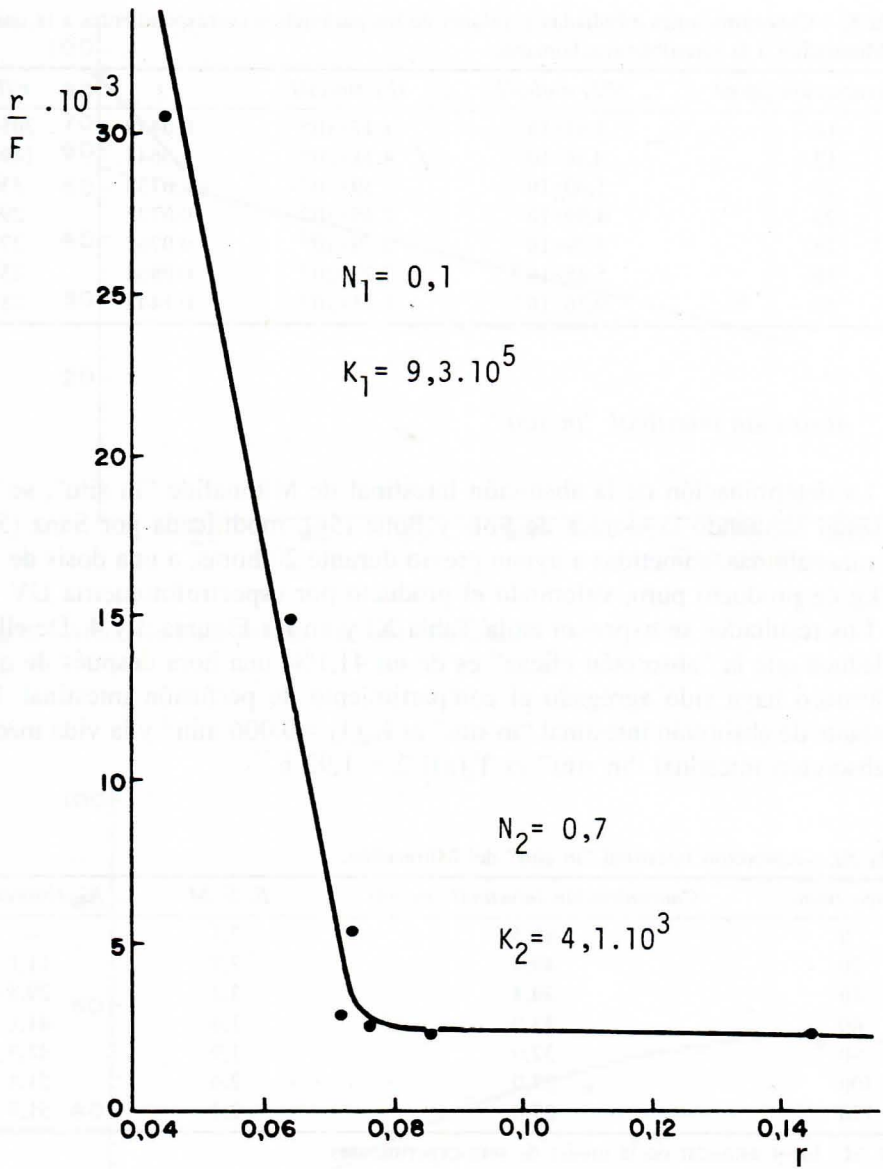


Fig. 2.—Unión a la seroalbúmina humana del Mitonafide.

Tabla X.—Concentraciones estudiadas y valores de los parámetros correspondientes a la unión del Mitonafide a la seroalbúmina humana.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	(PF) moles/l	(F) moles/l	r	r/(F)
10	$3,04 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-6}$	0.0449	30544
15	$4,36 \times 10^{-5}$	$4,31 \times 10^{-6}$	0.0644	14942
20	$5,00 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^{-5}$	0.0738	5309
23	$4,89 \times 10^{-5}$	$2,45 \times 10^{-5}$	0.0722	2947
25	$5,19 \times 10^{-5}$	$2,79 \times 10^{-5}$	0.0767	2749
30	$5,85 \times 10^{-5}$	$3,73 \times 10^{-5}$	0.0864	2316
50	$9,76 \times 10^{-5}$	$6,21 \times 10^{-5}$	0.1442	2322

### 6.2. Absorción intestinal "in situ"

La determinación de la absorción intestinal de Mitonafide "in situ", se ha realizado siguiendo la técnica de Sols y Ponz (56), modificada por Sanz (57) con ratas albinas, sometidas a ayuno previo durante 20 horas, a una dosis de 20 mg/kg de producto puro, valorando el producto por espectrofotometría UV.

Los resultados se expresan en la Tabla XI y en las Figuras 3 y 4. De ellos se deduce que la "absorción eficaz" es de un 41,1%, una hora después de que el fármaco haya sido agregado al compartimiento de perfusión intestinal. La constante de absorción intestinal "in situ" es  $K_a(1) = 0,006 \text{ min}^{-1}$  y la vida media de absorción intestinal "in situ" es  $T_a(x)1/2 = 1,92 \text{ h}$ .

Tabla XI.—Absorción intestinal "in situ" del Mitonafide.

Tiempo (min)	Concentración intestinal ( $\mu\text{g/ml}$ )	E. S. M.	% Absorción
0	88,3	7,1	—
20	49,8	2,5	11,1
40	39,3	2,2	29,8
60	33,0	1,8	41,1
80	32,0	1,9	42,9
100	27,0	2,6	51,4
120	27,0	2,3	51,8

E. S. M.: Error estándar de la media de seis experimentos.

### 6.3. Farmacocinética

Los estudios farmacocinéticos se realizaron tras la administración de Mitonafide marcado con tritio por vías i.v. y p.o. en ratas albinas a una dosis única de 20 mg/kg y  $1,65 \mu\text{Ci}$  de actividad radiactiva por rata. La cuantificación del producto se realizó por espectrometría de centelleo líquido, utilizando el método de

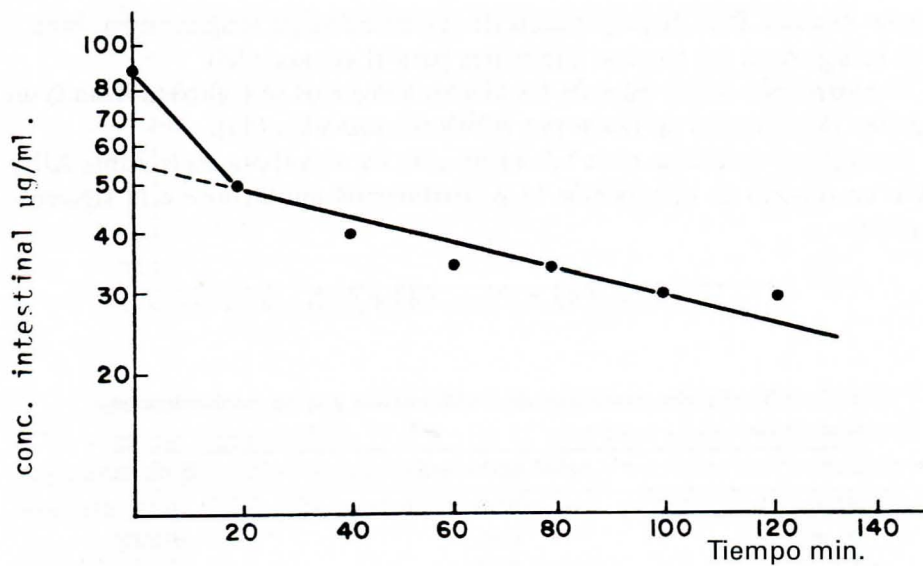


Fig. 3.—Absorción intestinal “in situ” del Mitonafide.

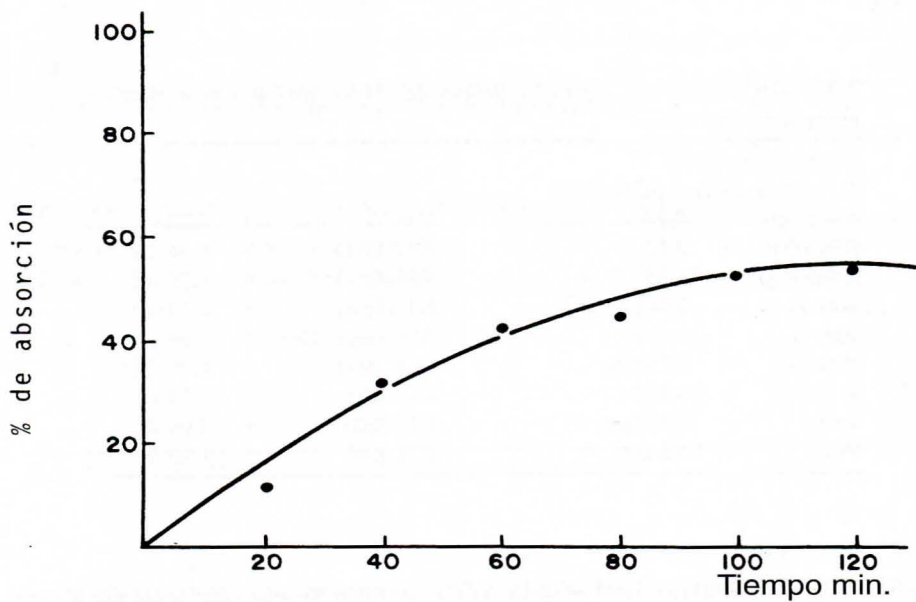


Fig. 4.—Grado de absorción intestinal “in situ” del Mitonafide.

estándar externo. Para la preparación de las muestras de sangre, orina, bilis y heces se siguieron las técnicas habituales para el conteo (58).

El tratamiento de los datos de los niveles hemáticos se realizó utilizando un programa de regresión no lineal por mínimos cuadrados (59).

Los valores obtenidos en la administración i.v se indican en la Tabla XII y siguen un modelo de distribución bicompartimental ajustándose a la siguiente ecuación:

$$C = 7,53 e^{-0,92t} + 2,41 e^{-0,039t}$$

Tabla XII.—Niveles hemáticos de  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración intravenosa.

<i>Tiempo</i>	<i>µg/ml equivalentes</i>	<i>E. S. M.</i>
10 min	9,39	0,78
30 min	6,86	0,73
1 h	5,12	1,35
2,5 h	3,09	0,05
4 h	2,16	0,12
6 h	1,99	0,05
16 h	1,30	0,32

Los parámetros farmacocinéticos se indican en la Tabla XIII.

Tabla XIII.—Parámetros farmacocinéticos del  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración intravenosa.

<i>Bicompartimental I. V.</i>		
A = Aiexp (- $\alpha$ t) + A2exp(- $\beta$ t)		
Ai(µg/ml) =	7,52	Vss(L) = 1,226
A2(µg/ml) =	2,41	K12(hr-1) = 0,56354
Dosis(mg) =	3,75	K21(hr-1) = 0,25085
$\alpha$ (hr-1) =	0,915	K10(hr-1) = 0,13861
$\beta$ (hr-1) =	0,038	AUC(mgL-1hr) = 71,64
to.5 $\alpha$ (hr) =	0,75738	CL(L.hr-1) = 0,052345
to.5 $\beta$ (hr) =	18,237	K12/K21 = 2,2465
Vo(L) =	0,37764	K12/K10 = 4,0657
Vt(L) =	0,84836	K21/K10 = 1,8098

Para la administración oral (Tabla XIV), se obtuvo una constante de absorción de 2,47 h<sup>-1</sup> y una vida media de absorción de 16,8 min. La biodisponibilidad obtenida fue del 94% de la vía oral frente a la vía intravenosa.

Tabla XIV.—Niveles hemáticos de  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración oral.

Tiempo	$\mu\text{g/ml}$ equivalentes	E. S. M.
15 min	4,22	0,39
30 min	7,63	0,69
1 h	5,44	0,55
2 h	3,62	0,20
4 h	2,56	0,17
6 h	0,91	0,24
24 h	0,20	0,05

E. S. M.: Error estándar de la media de seis determinaciones.

Los resultados para la excreción urinaria se recogen en las Tablas XV y XVI y en las Figuras 5, 6, 7 y 8. En la administración i.v. se obtiene una constante de excreción urinaria  $K_u = 0,097 \text{ h}^{-1}$  y una vida media de excreción urinaria  $t_{u/2} = 7,1 \text{ h}$ . En la administración oral, se obtiene  $K'_u = 0,064 \text{ h}^{-1}$  y  $t'_{u/2} = 10,8 \text{ h}$ .

Tabla XV.—Excreción urinaria del  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración intravenosa.

Tiempos horas	Valores acumulados % de dosis excretada	E. S. M.	% de la dosis que queda por excretar
6	19,39	1,42	12,29
24	29,84	1,64	1,84
30	30,40	1,71	1,28
48	31,68	1,50	0,0

E. S. M.: Error estándar de la media de tres determinaciones.

Tabla XVI.—Excreción urinaria del  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración oral.

Tiempos horas	Valores acumulados % de dosis excretada	E. S. M.	% de dosis que queda por excretar
6	13,88	2,34	15,06
20	17,40	2,74	11,54
28	23,02	3,15	5,92
47	27,09	3,69	1,85
72	28,94	6,82	0,0

E. S. M.: Error estándar de la media de seis determinaciones.

Con respecto a la excreción biliar, los resultados obtenidos para la eliminación del producto por esta vía tras su administración i.v. y p.o. se recogen en las Tablas XVII y XVIII y en la Figura 9.

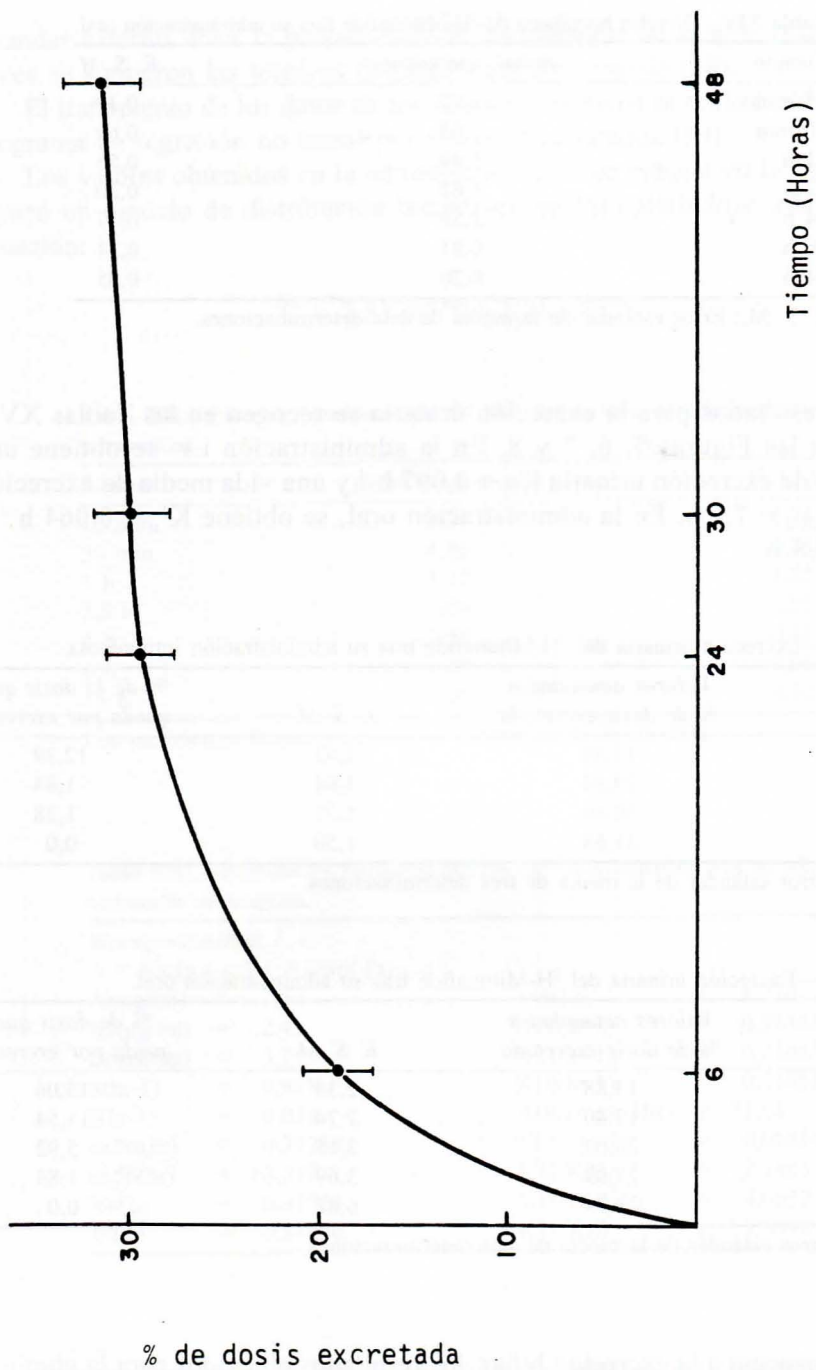


Fig. 5.—Excreción urinaria acumulada del  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración i. v.

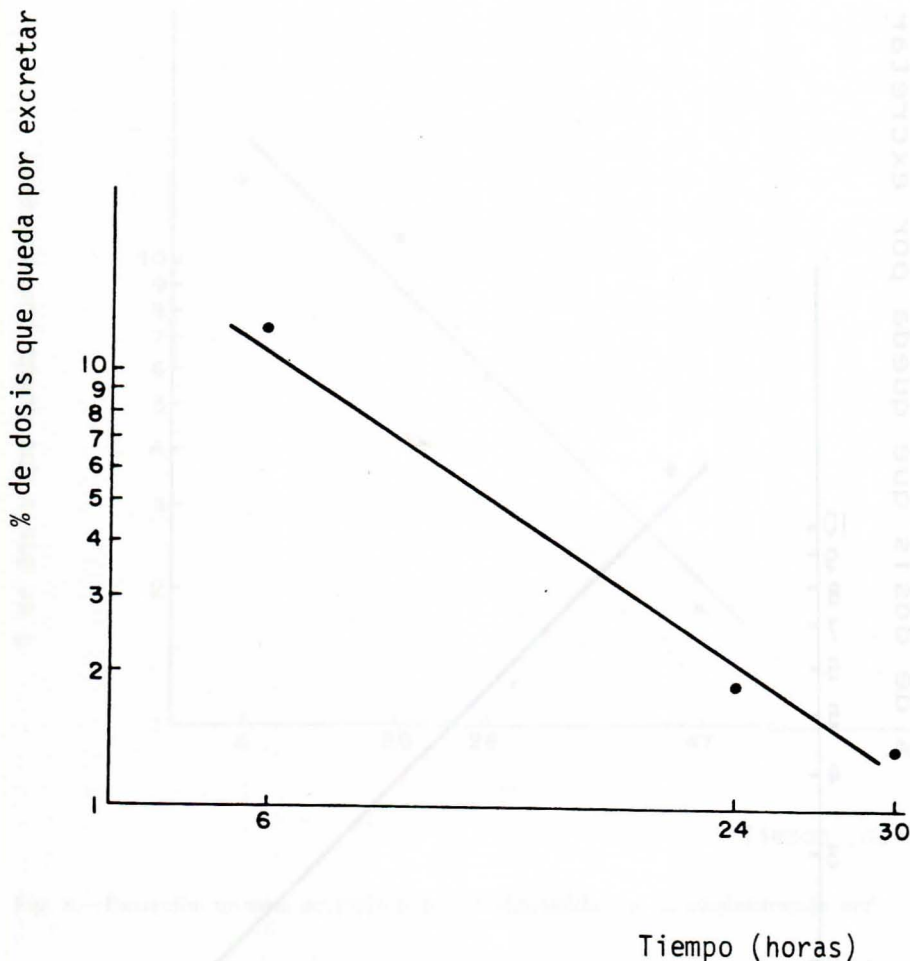


Fig. 6.—Excreción urinaria acumulada del  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración i.v.

La excreción biliar a las 2 horas de haber sido administrado el producto por vía i.v. es del orden del 15,67%. En la administración oral, a las 2,5 horas, se obtiene una excreción biliar del 4,46%.

La eliminación por heces a las 48 horas de haber sido administrado el fármaco por vía i.v. es del 56%.

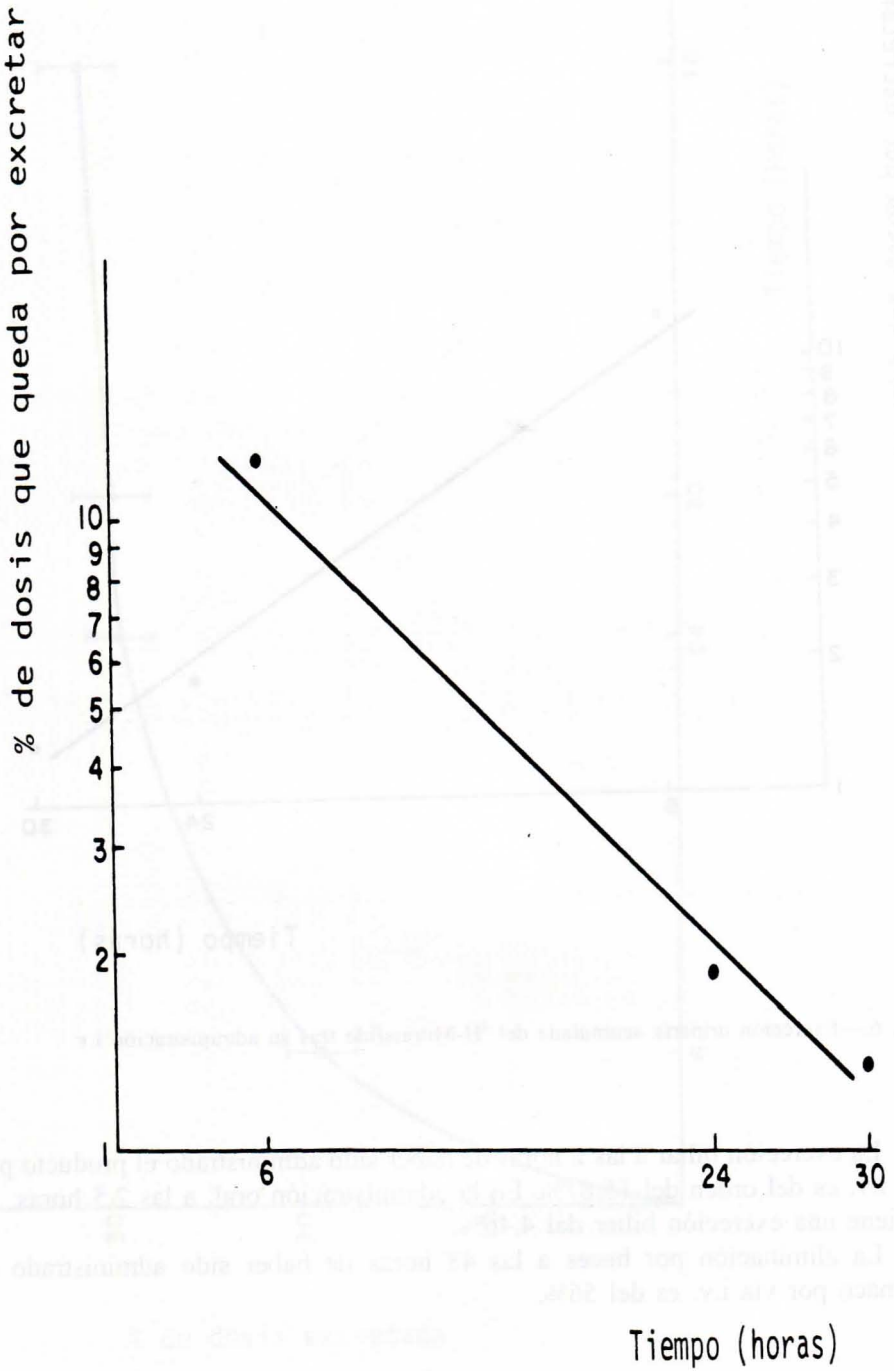


Fig. 7.—Excreción urinaria acumulada del  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración oral.



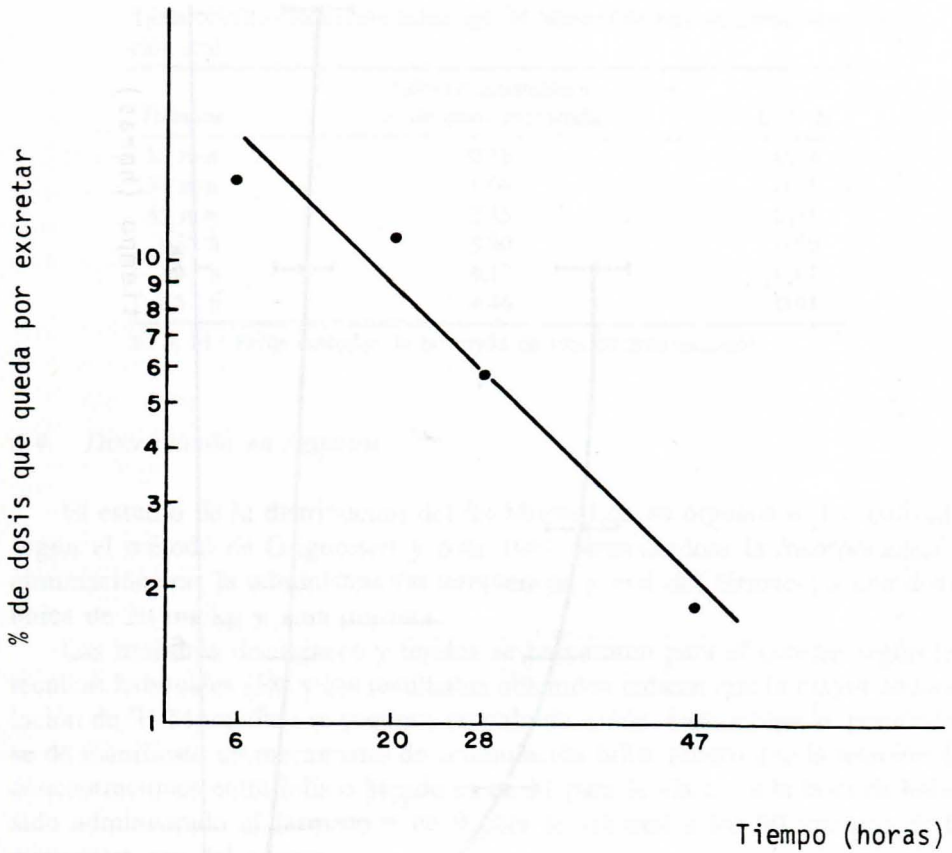


Fig. 8.—Excreción urinaria acumulada del  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración oral.

Tabla XVII.—Excreción biliar del  $^3\text{H}$ -Mitonafide tras su administración intravenosa.

Tiempos	Valores acumulados % de dosis excretada	E. S. M.
5 min	0,18	0,15
15 min	1,53	0,30
30 min	5,04	0,80
45 min	8,32	0,04
1 h	11,81	0,60
1.25 h	13,74	0,75
1.5 h	15,12	0,96
2.0 h	15,67	0,83

E. S. M.: Error estándar de la media de tres determinaciones.

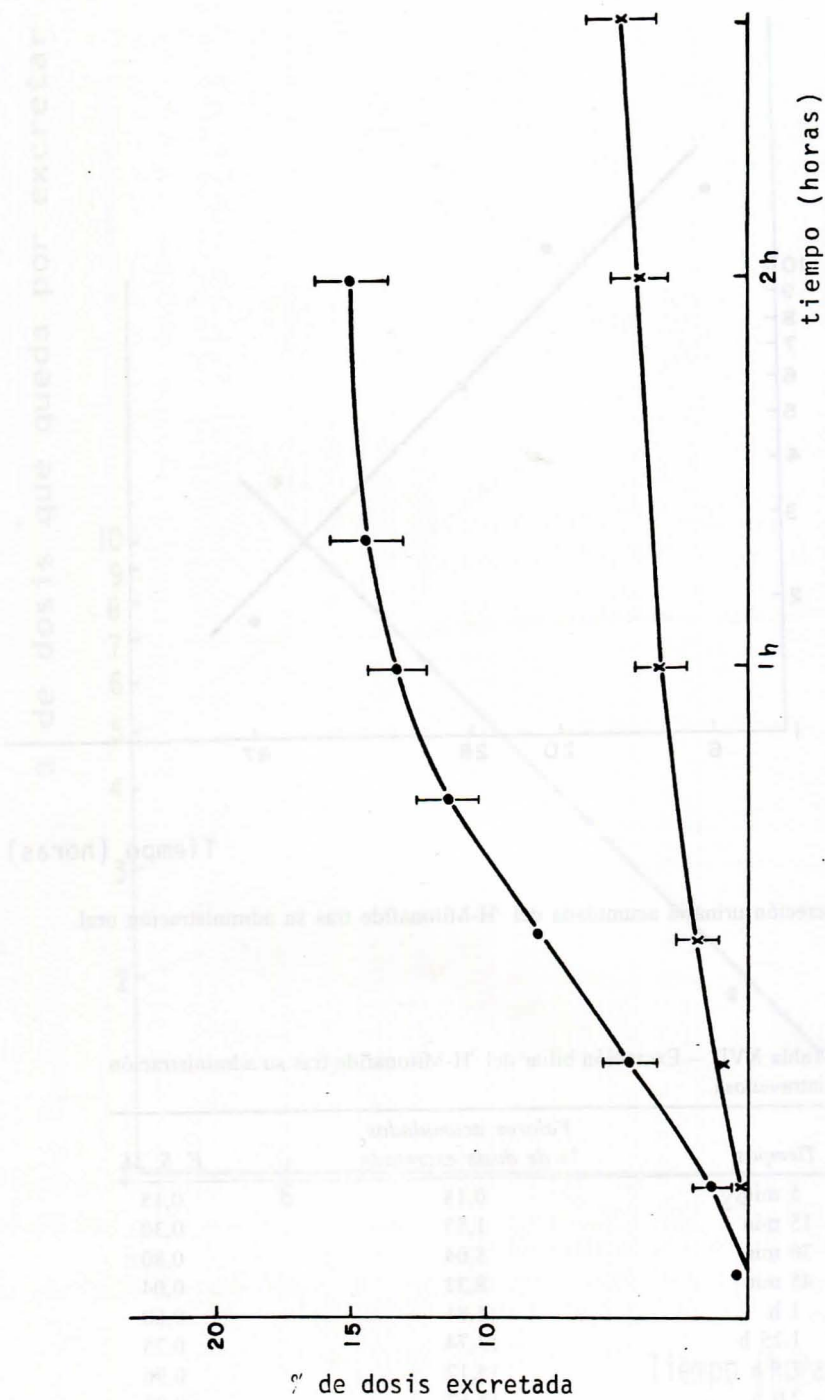


Fig. 9.—Excreción biliar acumulada del  $^3\text{H}$ -Mitonafide.

Tabla XVIII.—Excreción biliar del <sup>3</sup>H-Mitonafide tras su administración oral.

<i>Tiempos</i>	<i>Valores acumulados % de dosis excretada</i>	<i>E. S. M.</i>
15 min	0,38	0,14
30 min	1,04	0,13
45 min	2,15	0,35
1.25 h	3,50	0,50
2.0 h	4,17	0,62
2.5 h	4,46	0,93

E. S. M.: Error estándar de la media de tres determinaciones.

#### 6.4. Distribución en órganos

El estudio de la distribución del <sup>3</sup>H-Mitonafide en órganos se ha realizado según el método de Grigoresco y cols. (60), observándose la incorporación y eliminación tras la administración intravenosa y oral del fármaco, a una dosis única de 20 mg/kg y 1,65  $\mu$ ci/rata.

Las muestras de órganos y tejidos se prepararon para el contaje según las técnicas habituales (58) y los resultados obtenidos indican que la mayor acumulación de <sup>3</sup>H-Mitonafide se produce en pulmón, riñón, bazo e hígado, poniéndose de manifiesto un mecanismo de acumulación biliar puesto que la relación de concentraciones entre bilis e hígado es de 11 para la vía i.v. a la hora de haber sido administrado el fármaco y de 9 para la vía oral a los 30 minutos de la administración del mismo.

El estudio de paso a través de la barrera placentaria, se realizó en ratas preñadas de  $14 \pm 1$  día, tras la administración i.v. de una dosis única de 20 mg/kg y 1,65  $\mu$ ci/rata. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla XIX. Se observa que el fármaco pasa a través de la barrera placentaria y se acumula en algún órgano torácico o abdominal del feto.

Tabla XIX.—Niveles del <sup>3</sup>H-Mitonafide en fetos tras su administración intravenosa en ratas.

	<i>Dmp/mg</i>	<i>ESM</i>	<i>ng/mg Equivalentes</i>	<i>% respecto a sangre</i>
Sangre	6,83	0,58	6,32	—
Feto (cabeza)	8,56	0,56	7,93	125
Feto (tronco)	17,14	0,43	15,88	251
Feto (entero)	11,51	1,23	10,66	168
Líquido amniótico	1,33	0,12	1,23	19

Estos valores corresponden a la 1 h. de haber sido administrado el producto.

## 7. METABOLISMO

### 7.1. *In vitro*

El metabolismo "in vitro" del Mitonafide, se ha estudiado mediante preparaciones microsomales de hígado de rata (61), para conocer la capacidad metabolizadora de éstos sobre el fármaco, así como "in vivo" para determinar los niveles de citocromo P-450 en microsomas de hígado de ratas macho y hembra, tratados con este compuesto.

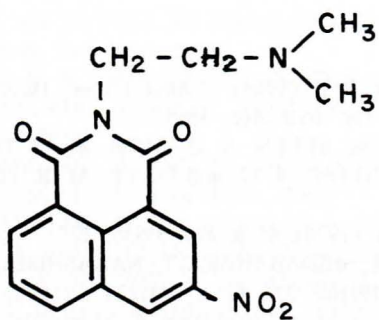
Para ello se añadió el Mitonafide a un preparado de microsoma de hígado de rata, siguiendo el proceso metabólico por CCF. Se observó la aparición de una mancha nueva cuyo  $R_f$  se correspondía con el del Amonafide (testigo). Puesto que la reacción ocurre en condiciones anaeróbicas (se inhibe con CO o  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  (5/95)), se puede aceptar que el citocromo P-450 es el responsable de esta reacción de reducción.

Por otra parte, el Mitonafide administrado i.v. durante tres días a ratas macho y hembra, produce un aumento no significativo del contenido de citocromo P-450 de los microsomas hepáticos de los machos, frente a una disminución significativa en los de las hembras, en comparación con los controles.

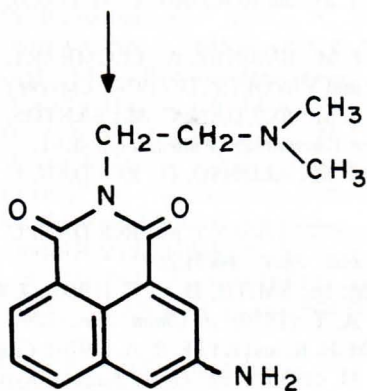
Estos resultados podrían explicar la mayor resistencia de las ratas machos a los efectos del fármaco.

### 7.2. *In vivo*

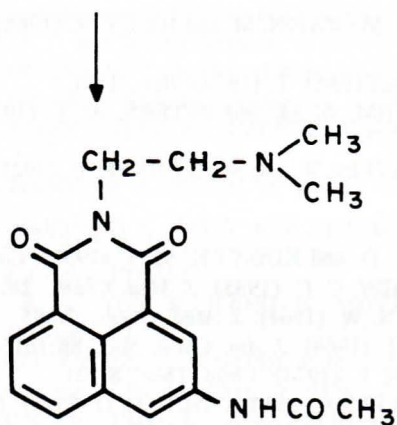
El metabolismo "in vivo" del Mitonafide se determinó tras su administración oral a ratas a una dosis de 20 mg/kg/día, durante 5 días. El fármaco y sus metabolitos se extrajeron de la orina con cloroformo y se identificaron mediante CCF y CG/EM. Se llegó a la conclusión de que la concentración de producto inalterado es menor que la de los principales metabolitos, que se indican en la siguiente secuencia de reacciones.



Mitonafide



Amonafide

40  
~

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) WEBEL, M. L. and TOMPSON, P. E. (1966): *J. Med. Chem.*, **10**:32.
- (2) STAMPA, S. (1968): *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.*, **39**:57.
- (3) MULLEE, M. T.; COX, D. D. and ALLEN, A. D. (1970): *Am. J. Vet. Res.*, **31**:1203.
- (4) HARGREAVES, M. K.; PRITCHARD, J. G. and DAVE, M. R. (1970): *Chem. Rev.*, **70**:439.
- (5) WADE, P. C. and VOGT, R. B. (1976): *U. S. Pat.*, **3**:935, 227.
- (6) SHIGEMATSU, T.; KASUGAI, M.; SHIDABAHARA, T.; NAKASHIMA, T. and TERAOKA, T. (1979): *Jap. Kokai Tokkyo*, **79**:160, 727. C. A., **93**:2247c (1980).
- (7) BRAÑA, M. F.; CASTELLANO, J. M. and ROLDÁN, C. M. (1973): *Pat. Esp.*, **410**:740. C. A., **86**:106, 236 (1977).
- (8) BRAÑA, M. F.; CASTELLANO, J. M.; JIMÉNEZ, A.; LOMBART, A.; RABADÁN, F. P.; ROLDÁN, C. M.; SANTOS, A. and VÁZQUEZ, D. (1978): *Current Chemotherapy*, 1216.
- (9) BRAÑA, M. F.; CASTELLANO, J. M.; ROLDÁN, C. M.; SANTOS, A.; VÁZQUEZ, D. and JIMÉNEZ, A. (1980): *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **4**:61.
- (10) BRAÑA, M. F.; CASTELLANO, J. M.; ALONSO, G.; ROLDÁN, C. M. and ROLDÁN, M. C. (1978): *Afinidad*, **35**:105.
- (11) BRAÑA, M. F.; SANZ, A. M.; CASTELLANO, J. M.; ROLDÁN, C. M. and ROLDÁN, C. (1981): *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.*, **16**(3):207.
- (12) BIRCH, A. J.; SALAHUD-DIN, M. and SMITH, D. C. C. (1966): *J. Chem. Soc.*, C, 523.
- (13) NURSTEN, H. E. and PETERS, A. T. (1950): *J. Chem. Soc.*, 729.
- (14) JONES, L. A.; JOYNER, C. T.; KIM, H. K. and KYFF, R. A. (1970): *Can. J. Chem.*, **48**:3122.
- (15) ISHIKAWA, N. and OKAZAKI, M. (1956): *Yúki Gósei Kagaka Kyokai Shi*, **14**:398. C. A., **51**:8051c (1957).
- (16) MAILLARD, J.; LANGLOIS, M.; RAPIN, M. and JOLLY, R. (1968): *Soc. Chin. France*, 2896.
- (17) DZIEWONSKI, K. and STOLYHWO, T. (1924): *Ber.*, 1531.
- (18) GRAYSHAN, P. M.; KADHIM, A. M. and PETERS, A. T. (1974): *J. Heterocyclic Chem.*, **11**:33.
- (19) STANDINOJER, H.; GOLDSTEIN, H. and SCHLENKER, E. (1921): *Helv. Chim. Acta*, **4**:342.
- (20) CASON, J.; WEISS, A. and MONTI, S. A. (1968): *J. Org. Chem.*, **33**:3404.
- (21) GEY, G. O.; COFFMAN, W. D. and KUBICEK, M. T. (1952): *Cancer Res.*, **12**:264.
- (22) ZEE-CHENG, K. Y. and CHEN, C. C. (1985): *J. Med. Chem.*, **28**:1216.
- (23) FREE, S. M. and WILSON, S. W. (1964): *J. Med. Chem.*, **7**:395.
- (24) HANSCH, C. and FUJITA, T. (1964): *J. Am. Chem. Soc.*, **86**:1616.
- (25) NYS, G. G. and REKKER, R. F. (1974): *Chim. Ther.*, **8**:521.
- (26) LEO, A.; YOW, P. Y. C.; SILIPO, C. and HANSCH, C. (1975): *J. Med. Chem.*, **18**:865; REKKER, R. F. and KORT, H. M. (1979): *Cur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **14**:479.
- (27) LEFFLER, J. E. and GRUNWALD, E. (1963): "Rates and Equilibria of Organic Reactions", J. Wiley, New York.
- (28) BONDI, A. (1964): *Phys. Chem.*, **68**:441.
- (29) HANSCH, C. (1974): Relations structure-activité. Seminario editado por la Societé de Chimie Therapeutique, Paris, 25-26 de marzo.
- (30) Lista 19 de I. N. N. Crónica de la OMS, **33**:5 (1979).
- (31) BRAÑA, M. F. y CASTELLANO, J. M.: Resultados sin publicar.
- (32) PAULL, K. D.; NASR, M. and NARAYANAN, V. L. (1984): *Arzneim-Forsch/Drug Res*, **34**(II):1243.