

Nuevos Antiagregantes con Acción Antihipertensiva. Nuevos Derivados de 1,2,4-Triazino(5,6-*b*)Indol y Compuestos Relacionados

A. MONGE*, J.A. PALOP*, C. RAMIREZ* y E. FERNANDEZ-ALVAREZ**

*Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia,
Universidad de Navarra, 31080 Pamplona e

**Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C., Juan de la Cierva, 3
28006 Madrid, España

RESUMEN. Se presenta una serie de nuevos derivados de 1,2,4-triazino(5,6-*b*)indol, que han sido sintetizados con el fin de investigar sus actividades como inhibidores de la agregación plaquetaria inducida por colágeno o por ADP a concentraciones de 5×10^{-4} M, así como de agentes antihipertensivos en ratas espontáneamente hipertensas. Todos los compuestos presentan moderada actividad antihipertensiva a 25 mg/kg ip y algunos de ellos también inhiben la agregación plaquetaria inducida por colágeno y ADP. Esta aproximación terapéutica es de especial interés en geriatría. SUMMARY. "New Platelet Aggregation Inhibitors with Antihypertensive Action. New Derivatives of 1,2,4-triazino(5,6-*b*)indole and Related Compounds". A series of new derivatives of 1,2,4-Triazino(5,6-*b*)Indole have been synthesized to investigate their activities as inhibitors of the platelet aggregation induced by collagen and adenosine diphosphate at concentrations below 5×10^{-4} M, as well as antihypertensive agents in spontaneously hypertensive rats. All compounds showed moderate antihypertensive activity at 25 mg/kg ip and some of them also inhibit the platelet aggregation induced by collagen and ADP. The interest in that therapeutic approximation has a particular interest in elderly people.

Los 1,2,4-triazino(5,6-*b*)indoles han sido investigados como antivirales¹, como antibacteriales y como antifúngicos^{2, 3}. Nosotros estamos desarrollando un programa de investigación en nuevos heterociclos nitrogenados condensados con indoles, en la esperanza de encontrar compuestos con actividad en el sistema cardiovascular.

Las propiedades antiagregantes de algunos derivados indólicos están bien documentadas⁴. Nosotros hemos descrito estructuras indólicas con actividad antihiper-

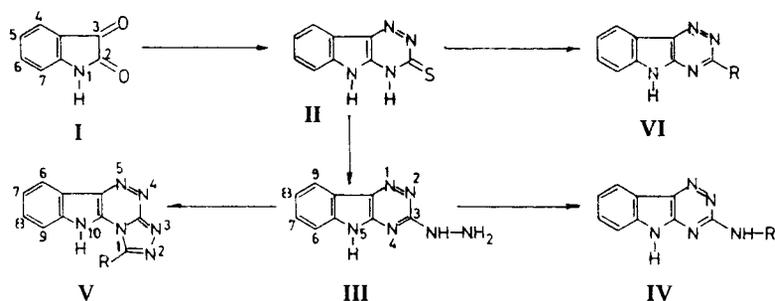
tensiva⁵. Planteamos ahora la obtención de derivados indólicos que presenten las dos actividades. El interés de esta aproximación terapéutica no es nueva⁶, pero en nuestro conocimiento éstos son los primeros esfuerzos por lograr estructuras indólicas en las que se presenten las dos actividades.

Esta publicación es continuación de trabajos previos recientemente publicados con estructuras de piridacino-indol⁷.

La determinación de las actividades antiagregantes, que se ha realizado de acuerdo

PALABRAS CLAVE: 1,2,4-Triazino(5,6-*b*)indoles; Agentes antihipertensivos; Inhibidores de la Agregación Plaquetaria.

KEY WORDS: 1,2,4-Triazino(5,6-*b*)indoles; Antihypertensive Agents; Platelet Aggregation Inhibitors.



R		R		R	
IV	a) $-N=C(CH_3)_2$	V	a) H	VI	a)
	b) $-N=C(CH_3)C_6H_5$		b) CH_3		b)
	c) $-N=CHC_6H_5$		c) C_6H_5		

con métodos descritos con anterioridad⁸, suponen medir la modificación en la agregación de plaquetas inducida por dos agregantes, adenosina-5'-difosfato (ADP) y colágeno. La determinación de la actividad antihipertensiva se ha realizado sobre ratas espontáneamente hipertensas (SHR) según hemos descrito⁹.

Indol 2,3-diona(isatina, I) se hace reaccionar con tiosemicarbácida para obtener 4H-1,2,4-triazino(5,6-b)indol-3-tiona (II). Este último, por reacción con hidrato de hidracina, según un método descrito con anterioridad, lleva a 3-hidracino-1,2,4-triazino(5,6-b)indol (III). La condensación de este último compuesto con diferentes aldehídos y cetonas (acetona, acetofenona y benzaldehído) lleva a las hidrazonas (IV). Los triazoles (V) se obtuvieron por reacción de III con ácido fórmico, ácido acético o cloruro de benzoílo (Va: R = H; Vb: R = CH_3 ; Vc: R = C_6H_5). Por reacción de II con aminas (piperidina, morfolina) se obtuvieron los compuestos VIa y VIb, respectivamente.

Los rendimientos de las reacciones son buenos, variando entre el 75 y el 95%. Los productos se han identificado inequívocamente por sus espectros de IR y RMN, así como por su análisis elemental de CHN. No fue posible obtener un buen análisis elemental para VIa, aunque los espectros de IR y RMN eran satisfactorios.

PARTE EXPERIMENTAL

Compuestos ensayados

Todos los compuestos nuevos fueron caracterizados por análisis elemental, espectro de IR y espectro de 1H -RMN. Los espectros de IR fueron registrados en un aparato Perkin-Elmer 681, en pastillas de BrK y las frecuencias se expresan en cm^{-1} . Los espectros de 1H -RMN se realizaron en un aparato Perkin-Elmer R-32 (90 MHz) con $SiMe_4$ como referencia interna. Los puntos de fusión se determinaron en microscopio con platina calefactora y no están corregidos. Los análisis elementales se obtuvieron de muestras secas al vacío (sobre pentóxido de fósforo a 1-2 mm Hg, durante 2-3 h a

50-60 °C) y están en un intervalo del 0,4% de los valores teóricos.

Indol 2,3-diona(isatina, I). En un producto comercial (Fluka).

4H-1,2,4-Triazino(5,6-b)indol-3-tiona (II). Se ha preparado a partir de I por reacción con tiosemicarbazida según un método descrito con anterioridad en la bibliografía¹⁰.

3-Hidracino-1,2,4-Triazino(5,6-b)indol (III). Este compuesto se ha preparado según un método descrito con anterioridad en la bibliografía¹¹. Su hidrocloreto se ha preparado a partir de 30 milimoles de III por tratamiento con etanol absoluto saturado de cloruro de hidrógeno (15 ml), en caliente. Al enfriar la disolución precipita el producto en forma de cristales amarillos, *pf* = 269 °C, rendimiento 90% (etanol); IR: 1670, 1630, 1610 (CN); ¹H-RMN: 7.25-6.15 (sa, 3H, NH-NH₂); 8.25-7.20 (m, 4H, indol); 11.3-10.8 (sa, 1H, NH).

Hidrazonas de 3-Hidrazino-1,2,4-Triazino(5,6-b)indol (IV). Estos compuestos se obtuvieron calentando a reflujo III (30 milimoles) con el correspondiente aldehído o cetona (2 ml), y dioxano (10 ml) durante 1-4 h (TLC). Cuando la mezcla de reacción se enfría, el compuesto cristaliza. De esta forma se obtienen los siguientes compuestos: *Compuesto IVa*, de acetona, sólido amarillo, *pf* > 285 °C, rendimiento 90% (etanol); IR: 1610 (C = N); ¹H-RMN: 2.1 (s, 6H, CH₃); 7.3-8.4 (m, 5H, indol + NH); 12.1 (s, 1H, NH indol). *Compuesto IVb*, de benzaldehído, sólido amarillo, *pf* > 285 °C, rendimiento 80% (etanol); IR: 1620 (C = N); ¹H-RMN: 7.5-8.4 (m, m, 11H, indol + NH + C₆H₅); 8.5 (s, 1H, N = CH). *Compuesto IVc*, de acetofenona, sólido amarillo, *pf* = 282 °C, rendimiento 85% (etanol);

IR: 1610 (C = N); ¹H-RMN: 2.4 (s, 3H, CH₃); 7.4-8.4 (m, 10H, C₆H₅ + Indol + NH); 11.9 (s, 1H, NH indol).

10H-1,2,4-Triazolo(3,4-c)1,2,4-triazino(5,6-b)indoles (V). Se calienta a ebullición una suspensión de III (30 milimoles) y 40 ml de ácido fórmico (o acético o cloruro de benzoílo), durante 4-5 h (TLC). Al enfriar la mezcla de reacción aparece un precipitado que se recoge y se recrystaliza. De esta forma se prepararon los compuestos Va-c. *Compuesto Va*, de ácido fórmico, sólido amarillo, *pf* > 285 °C, rendimiento 75% (etanol); IR: 1610 (C = N); ¹H-RMN: 7.3-8.3 (m, 4H, indol); 9.5 (s, 1H, H-1). *Compuesto Vb*, de ácido acético, sólido amarillo, *pf* > 285 °C, rendimiento 90% (etanol); IR: 1610 (C = N); ¹H-RMN: 2.8 (s, 3H, CH₃); 7.3-8.3 (m, 4H, indol). *Compuesto Vc*, de cloruro de benzoílo, sólido amarillo, *pf* > 284 °C, rendimiento 95% (etanol); IR: 1660 (C = N); ¹H-RMN: 7.5-8.3 (m, 9H, indol + C₆H₅); 12.4 (s, 1H, NH indol).

3-Amino-1,2,4-Triazino(5,6-b)indoles (VI). Se calienta a reflujo durante 16 horas una suspensión de II (30 milimoles) y 25 ml de piperidina (o morfolina). Terminada la calefacción, al enfriar aparece un precipitado que se recoge y recrystaliza. De esta forma se preparan VIa-b. *Compuesto VIa*, de piperidina, sólido amarillo, *pf* > 285 °C, rendimiento 80% (etanol); IR: 1590 (C = N); ¹H-RMN: 2.12-1.70 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂); 3.60-3.25 (m, 4H, NCH₂); 8.4-7.6 (m, 4H, indol). *Análisis* para C₁₄H₁₅N₅: Calculado %: C, 66.4; H, 5.93; N, 27.67. Encontrado: C, 59.98; H, 4.97; N, 25.41. *Compuesto VIb*, de morfolina, sólido amarillo, *pf* > 285 °C, rendimiento 83% (etanol); IR: 1600 (CN); ¹H-RMN: 3.8 (sa, 8H, CH₂); 7.4-8.3 (m, 4H, indol); 13.0 (s, 1H, NH).

Tabla 1. Actividad antihipertensiva (variación en %), en ratas SHR, ip.

Compuesto	1 h	3 h	5 h	24 h	Dosis (mg/kg)
III. ClH	-43	-55	-46	-23	25
	-14	- 7	- 2	0	5
	- 7	- 7	- 2	0	1
IVa.	- 7	- 7	-11	0	25
IVb.	- 5	- 3	- 3	0	25
IVc.	- 8	- 5	- 4	-15	25
Va.	- 8	- 5	- 3	0	25
Vb.	- 6	0	- 2	0	25
Vc.	- 9	- 8	-20	- 2	25
VIa.	- 7	- 3	-15	- 2	25
VIb.	- 4	- 1	- 4	- 5	25
Hidrazina	-20	-20	-10	0	1

Ver referencia⁷ sobre condiciones de experimentación.

Tabla 2. Inhibición de la agregación plaquetaria (%) inducida por ADP y Colágeno.

Compuesto	ADP (5.10^{-5} M)	Colágeno (0.2 mg/ml)
III ClH	0	0
IVa.	15	15
IVb.	15	55
IVc.	65	75
Va.	20	0
Vb.	0	0
Vc.	0	25
VIa.	20	60
VIb.	0	35

Ver referencia⁷ sobre condiciones de experimentación.

En las condiciones del ensayo, Hidralazina no tiene ningún efecto inhibitor sobre los agentes proagregantes estudiados. En las mismas condiciones, el ácido acetilsalicílico los inhibe completamente.

Actividad antihipertensora

Los compuestos a ensayar fueron investigados en ratas hipertensas de ocho semanas, machos y hembras de la raza Okamoto con pesos entre 300-350 g y niveles de presión sistólica ≥ 190 mm Hg, con ritmo cardíaco entre 400 y 650 latidos por minuto. Los cambios en la presión arterial (PA) y en el ritmo cardíaco (RC), fueron medidos en la cola de los animales, por transducción mecánica (W + W, BP-8005) y registrado en papel. Las dosis que se indican para cada producto fueron administradas a cinco animales, registrándose la PA y el RC a los tiempos que se indican. Los compuestos fueron administrados (ip, po, 2,5 ml/kg), disueltos o suspendidos en suero fisiológico o en suero fisiológico con 0,2% de carboximetilcelulosa y Tween 80 al 1,0%, a la dosis inicial de 25 mg/kg; los compuestos más activos se ensayaron posteriormente a concentraciones menores. Los resultados de estos experimentos, se presentan en la Tabla 1.

Actividad antiagregante plaquetaria

La agregación se determinó empleando un agregómetro de sangre total (Chrono-Long), según método descrito con anterioridad⁷, a 37 °C y con agitación. En el ensayo se colocan en tubos de vidrio siliconado 0,45 ml de sangre total, 0,45 ml de suero fisiológico y 0,05 ml de una disolución en dimetilsulfóxido (DMSO) del compuesto a ensayar, a la concentración preestablecida. La mezcla se mantiene durante 60 minutos a 37 °C y se introduce la disolución en el agregómetro, adicionando a continuación 0,05 ml del agente agregante (ADP, 2×10^{-5} M, de la casa Sigma, o colágeno, 0,2 mg/ml en tampón de Michaelis (9:1) de la casa Stago, registrando la curva durante 5 minutos. La concentración final de los compuestos estudiados fue de 10^{-5} . Todas

las experiencias se realizaron con ácido acetilsalicílico (ASA) como control del 100% de inhibición. En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA: RESULTADOS Y DISCUSION

El producto más activo como antihipertensivo resultó ser III, clorhidrato de 3-hidrazino - 1,2,4 - Triazino (5,6-*b*) indol. Este compuesto, como se indica en la Tabla 1, a dosis de 25 mg/kg presenta un importante efecto en la disminución de la presión arterial que persiste durante 24 horas. La actividad continúa siendo importante a concentraciones menores (5 y 1 mg/kg). Todos los compuestos resultaron ser activos a la concentración superior elegida (25 mg/kg).

Las hidrazonas (IV) y las aminas (VI), resultaron ser buenos inhibidores de la agregación inducida por ADP y colágeno; por el contrario no resultaron activos los triazino derivados de la serie V (Tabla 2).

Los resultados anteriores, en lo que se refiere a la presencia de cadena lateral (compuestos IV), en relación con los productos que resultan de la incorporación de esta cadena en un ciclo (compuestos V), son concordantes con lo descrito recientemente por nosotros⁷ para una serie similar de compuestos derivados de 5H-piridazino (4,5-*b*)indol.

La actividad encontrada abre una línea de investigación hacia un nuevo tipo de estructuras.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT) de España.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gladych, J.M.Z., R. Hornby, J.H. Hunt, D. Jack, J.J. Boyle, R.J. Ferlauto, R.F. Haff, C.G. Kormendy, F.J. Stanfield y R.C. Stewart (1972) *J. Med. Chem.* 15: 277-81
2. Mohsen, A., M.E. Omar, N.H. Eshba y H.M. AboutShleib (1986) *J. Heterocyclic Chem.* 23: 1731-5
3. Dhaka, K.S., H.S. Chaudhary, K.S. Sharma y H.K. Pujari (1976) *Indian J. Chem., Sect. B* 14: 541
4. Cross, P.E., R.P. Dickinson (1984) *Second SCI-RSC Medicinal Chemistry Symposium* (Emmett, J.C. Ed.); Smith Kline French Research, Cambridge, England, págs. 268-85
5. Monge, A., I. Aldana, P. Parrado, M. Font y E. Fernández-Alvarez (1982) *J. Pharm. Sci.* 12: 1406-8
6. Wright, W.B., J.B. Press, P.S. Chan, J.W. Marsico, M.F. Haug, J. Lucas, J. Tuber y A.S. Tomcufcik (1986) *J. Med. Chem.* 29: 523-30
7. Monge, A., P. Parrado, M. Font y E. Fernández-Alvarez (1987) *J. Med. Chem.* 30: 1029-35
8. Monge, A., I. Genua, J.A. Palop, M.T. Martínez, F. Roldán y J. Fernández (1978) *J. Pharm. Sci.* 67: 1025-7
9. Monge, A., M.J. Gil, A. Basilio, A. Giraldez y E. Fernández-Alvarez (1986) *Eur. J. Med. Chem.* 21: 251-4
10. Joshi, K.C. y P. Chand (1980) *J. Heterocyclic Chem.* 17: 1783-4
11. Cardinal, D.C. y R.J. Flowers (1980) *J. Pharm. Meth.* 3: 135-8