



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 677**

51 Int. Cl.:
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07764402 .9**
96 Fecha de presentación : **20.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2049540**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **Derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina, métodos para su producción y su uso como agentes virales.**

30 Prioridad: **22.06.2006 DE 10 2006 029 074**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2011

73 Titular/es: **DRITTE PATENTPORTFOLIO
BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT mbH & Co. KG.
Berliner Strasse 1
12529 Schönefeld/Ot Waltersdor, DE
Vadim Makarov**

72 Inventor/es: **Makarov, Vadim;
Wutzler, Peter;
Schmidtke, Michaela y
Dahse, Hans-Martin**

74 Agente: **Blanco Jiménez, Araceli**

ES 2 359 677 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de 4-amino-3-amilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina, métodos para su producción y su uso como agentes virales.

La invención se refiere a nuevos derivados de 4-amino-3-amilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina, a métodos para su producción y a su uso como agentes antivirales, preferentemente para el tratamiento de infecciones con el picornavirus.

Los picornavirus, especialmente los enterovirus y los rinovirus, provocan un espectro muy amplio de enfermedades en el ser humano. El enterovirus presenta 60 serotipos humanopatógenos diferentes (Melnick J en: Fields B *et al.*, editors. Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996, 655-712). Las infecciones con enterovirus, echovirus, coxsackievirus A y B trascurren, muchas veces, con fiebre no específica y provocan enfermedades de las vías respiratorias altas que no pueden distinguirse, en muchos casos, de las infecciones con rinovirus. Los cuadros clínicos más severos, que también pueden presentarse como epidemias, son la conjuntivitis hemorrágica, la herpangina, la fiebre aftosa, la meningitis aséptica, la encefalitis y la miocarditis aguda. A su vez, los diferentes tipos de virus pueden provocar exactamente los mismos síntomas, o un tipo de virus puede provocar cuadros clínicos muy distintos. Con la introducción de los métodos modernos y sensitivos en el diagnóstico de los virus se consiguió la comprobación de un ARN enterovírico persistente, así como de proteínas víricas en enfermedades crónicas como, por ejemplo, la diabetes de tipo II, la poliomiotis y, sobre todo, la miocarditis crónica. Las infecciones enterovíricas persistentes también aparecen en pacientes con agammaglobulinemia y se manifiestan como meningocelalitis enterovírica persistente. Como efecto secundario, en muchos casos se observaron dermatomiositis o polimiositis. Los rinovirus presentan aproximadamente 100 serotipos. Las infecciones con el rinovirus provocan más de la mitad de las enfermedades respiratorias de las vías altas en el ser humano (Couch RB en: Fields BM *et al.*, editors: Fields Virology, 3ª edición. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 713-35). Con una duración media de enfermedad de aproximadamente 10 días, estos resfriados sin complicaciones provocan, anualmente, millones de visitas al médico y absentismo laboral y escolar. Las complicaciones que se presentan son la otitis media, sinusitis, exacerbación con asma y fibrosis quística así como infecciones del tracto respiratorio bajo, sobre todo en niños pequeños, pacientes mayores o pacientes con inmunosupresión. Por la diversidad de los tipos, actualmente no existe ninguna profilaxis mediante vacunación. A causa de los absentismos laborales, visitas al médico y medicamentos asociados con estas enfermedades, los rinovirus y enterovirus provocan enormes costes cada año. El tratamiento de estas infecciones víricas es, hasta la actualidad, más bien una reacción a los síntomas porque no disponemos de medicamentos específicos para los virus (Rotbart HA: Antiviral Res 2002, 53 (2), 83-98). Además, en muchos casos se prescriben antibióticos innecesariamente. Por ello, es esencial el desarrollo de nuevos viostáticos.

Los resultados de una búsqueda intensa para encontrar posibilidades de tratamiento de las infecciones con enterovirus y rinovirus se resumieron en 2002 en un artículo de Rotbart (Rotbart HA: Antiviral Res 2002, 53(2), 83-98). La ribavirina, por ejemplo, inhibe la enzima de la célula huésped, la 5'-monofosfato(IMP)-dehidrogenasa. Mediante la desactivación de la enzima clave para la síntesis de los nucleótidos de purina, la replicación de los picornavirus *in vitro* e *in vivo* queda inhibida. Además, se quiere introducir ribavirina directamente en el genoma de los poliovirus para actuar, adicionalmente como mutágeno para el ARN de los virus (Crotty S *et al.*: Nat Med, 2000, 6(12), 1375-9). A causa de los efectos secundarios tan severos, estos compuestos no se utilizan para el tratamiento de las infecciones con enterovirus y rinovirus. Unas dianas específicas para la inhibición de la síntesis del ARN vírico son el propio genoma, la polimerasa de ARN dependiente del ARN vírico y otras proteínas necesarias para el complejo de replicación. Desde hace mucho tiempo se conocen las guanidinas, tiosemicarbazonas, bencimidazoles, dipiridamoles y flavonas como inhibidores de las polimerasas de distintos picornavirus en cultivos celulares. Los resultados obtenidos *in vivo* fueron muy diversificados. Los candidatos más prometedores con una actividad muy amplia contra el enterovirus y rinovirus son los derivados de la enviroxima. La enviroxima inhibe la síntesis de la hebra positiva del ARN al vincularse con la proteína vírica 3A que es necesaria para la formación de intermediarios del ARN en la propagación vírica (Henz BA y Vane LM: J Virol, 1995, 69(7), 4189-97). En los estudios clínicos se detectaron efectos moderados o ningún efecto, una mala farmacocinética y efectos secundarios no deseados (Miller FD *et al.*: Antimicrob Agents Chemother, 1985, 27(1), 102-6). Todavía no se han obtenido datos clínicos de derivados más nuevos con una biodisponibilidad y aceptabilidad mejoradas.

Basándose en los conocimientos sobre la estructura fina y la función de la proteasa viral 2C, se ha desarrollado el inhibidor de proteasa AG 7088. AG 7088 actúa en el cultivo celular en el área de concentración nanomolecular contra 48 tipos de rinovirus y coxsackievirus A21, B3, enterovirus 70 y echovirus 11 (Pattick AK *et al.*: Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(10), 2444-50). Hasta la actualidad, se desconocen los datos finales de estos estudios clínicos.

Cuando se descubrió la estructura molecular de los cápsides, por primera vez se pudieron crear las condiciones previas para el diseño con el fin de bloquear los cápsides, las llamadas "sustancias WIN" (Diana GD: Curr Med Chem 2003, 2, 1-12). Éstas inhiben la absorción y/o la eliminación de capas de los rinovirus y enterovirus. Algunas de las sustancias WIN actúan de forma altamente específica sólo contra un género o tipo vírico de los picornavirus. Otros derivados inhiben la propagación del rinovirus y enterovirus. Entre las sustancias WIN se encuentran, entre otras, el arildon, disoxaril y pirodavidir. Estos compuestos muestran unos efectos antivirales muy buenos en el cultivo celular. Sin embargo, la pésima solubilidad (arildon), una biodisponibilidad baja (arildon y disoxaril), la rápida metabolización y eliminación (disoxaril y WIN 54954) y los efectos secundarios como erupción epidérmica (WIN 54954) imposibilitaron una aplicación clínica. Se depositaron grandes esperanzas en el pleconaril, otro bloqueador de los cápsides.

El pleconaril posee una biodisponibilidad oral muy buena e inhibe, después de vincularse con la bolsa hidrófoba en el cápside vírico, la penetración de los rinovirus, enterovirus y coxsackievirus (Pevear DC *et al.*: Antimicrob Agents Chemother 1999, 43(9), 2109-15; McKinlay MA *et al.*: Annu Rev Microbiol 1992, 46, 635-54). De esta manera, puede que sea efectivo contra un espectro bastante amplio de enfermedades víricas, desde el resfriado común hasta la meningitis viral o la miocarditis. Se observaron resistencias de los rinovirus, enterovirus 71 y coxsackievirus B3 (Ledford RM *et al.*: J Virol 2004, 78(7), 3663-74; Groarke JM *et al.*: J Infect Dis 1999, 179(6), 1538-41). Los estudios clínicos con niños y adultos que padecían de una meningitis por enterovirus (Abzug MJ *et al.*: Pediatr Infect Dis J, 2003, 22, 335-41) y de infecciones respiratorias provocadas por el rinovirus (Hayden FG *et al.*: Antivir Ther, 2002, 7, 53-65; Hayden FG *et al.*: Clin Infect Dis, 2003, 36, 1523-32) produjeron resultados positivos. Sin embargo, el efecto terapéutico comprobado no fue suficiente como para la certificación del pleconaril (Picovir, Viropharma, EEUU) para el tratamiento de infecciones por rinovirus en EEUU. En marzo del 2002 se presentó una solicitud a la FDA (Food and Drug Administration) que la denegó a causa de la insuficiencia del éxito terapéutico y la aparición simultánea de efectos secundarios comprobados.

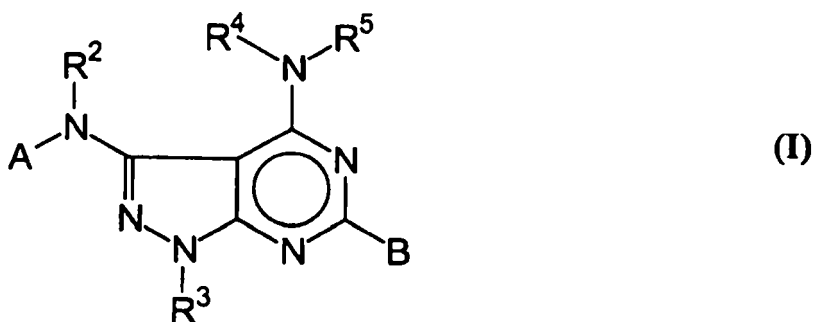
Además, se han descrito pirazolpirimidinas como antagonistas del CRF (factor liberador de corticotropina) (p. ej. en la EP 674 642 y EP 691 128) que, por ejemplo, inhiben la adenosinquinasa (EP 496 617 o US 4,904,666), la xantinaoxigenasa (J. Heterocyc. Chem. 19, 1565, 1982) u otros sistemas enzimáticos (US 2,965,643 y US 3,600,389).

Por lo tanto, sigue existiendo el objetivo urgente en la investigación antiviral de desarrollar un viroestático altamente efectivo para el tratamiento de enfermedades provocadas por el rinovirus y enterovirus. Los nuevos compuestos deben ser bien aceptables y superar las resistencias existentes contra, por ejemplo, el pleconaril.

La WO 00/43394 A revela derivados de pirazol[3,4-d]pirimidina sustituidos según la fórmula general I y su uso para agentes antivirales.

El objetivo de la presente invención es la indicación de otros derivados de pirazol[3,4-d]pirimidina según la fórmula general I así como su preparación y uso, los cuales pueden utilizarse como agentes contra el enterovirus y el rinovirus y superar las desventajas indicadas del estado de la técnica, especialmente los problemas acerca de la resistencia y la no aceptabilidad de los medicamentos correspondientes.

Según la invención, este objetivo se soluciona mediante derivados de 4-amino-3-amilamino-6-amilpirazol[3,4-d]pirimidina específicamente sustituidos según la fórmula general I, inclusive sus compuestos de sal farmacéuticamente aceptables,



en la que:

- los grupos A y B son, independientemente entre sí, fenilo, naftilo, piridilo, quinolilo, pirazinilo, pirazolilo, triacililo, imidazolilo, furanilo, tienilo, y en el que en cada uno de los grupos anteriormente mencionados e independientemente el uno del otro se puede sustituir de uno a tres átomos de hidrógeno por el residuo R¹ que se determina a continuación,
- el residuo R¹ puede ser NO₂, CN, CONR², COOR², CHO, CONH₂, un halógeno, un radical alifático saturado o insaturado, lineal o ramificado con 1 a 7 elementos de cadena, un radical alcanol saturado o insaturado, lineal o ramificado con 1 a 8 elementos de cadena, OR², SR², NR², SO₂NR³, un di-fluorometilo o trifluorometilo, un fenilo,
- los residuos R², R³, R⁴, R⁵ que pueden ser, independientemente, H, un radical alifático saturado o insaturado, halogenado o no halogenado, lineal o ramificado con 1 a 7 elementos de cadena, bencilo, fenilo o naftilo, un ciclo monoheterogéneo o poliheterogéneo saturado o insaturado con los átomos heterogéneos N, S, O, y en el que cada uno de los grupos anteriormente mencionados puede sustituirse, de forma independiente, con flúor, cloro, bromo, trifluorometilo, alquilo, alcoxilo, ciano, nitro, amino, aminoalquilo, C(O)-alquilo, C(O)O-alquilo, bencilo, fenilo o naftilo.

ES 2 359 677 T3

En las reivindicaciones dependientes se indican formas de realización ventajosas de los derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina y métodos para su preparación y posibilidades de aplicación que no limitan la presente invención de ninguna forma a estas formas de realización ventajosas.

5 En una forma de realización preferida, la invención se refiere a compuestos según la fórmula general (I), seleccionados del grupo de los 6-fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidinas, comprendiendo:

4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina,

10 4-amino-6-(tri-R¹)fenil-3-fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina,

1-alquilo-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina,

15 4-amino-1,6-di(tri-R¹)fenil-3-fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilalquiloaminopirazol[3,4-d]pirimidina,

1-alquilo-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilalquiloaminopirazol[3,4-d]pirimidina.

20 En una forma de realización ventajosa, la invención también incluye 6-fenilaminopirazol[3,4]pirimidinas según la fórmula general (I), comprendiendo:

4-amino-3-(3-fluorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

25 4-amino-3-(3-fluorofenil)amino-6-(4-clorofenil)pirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(3-cloro)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

30 4-amino-3-(3-metoxi)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(4-fluorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

35 4-amino-3-(4-fluorofenil)amino-6-(4-clorofenil)pirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(4-clorofenilo)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(3-fluorofenilo)amino-1-metil-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

40 4-amino-1-bencil-3-(3-fluorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina.

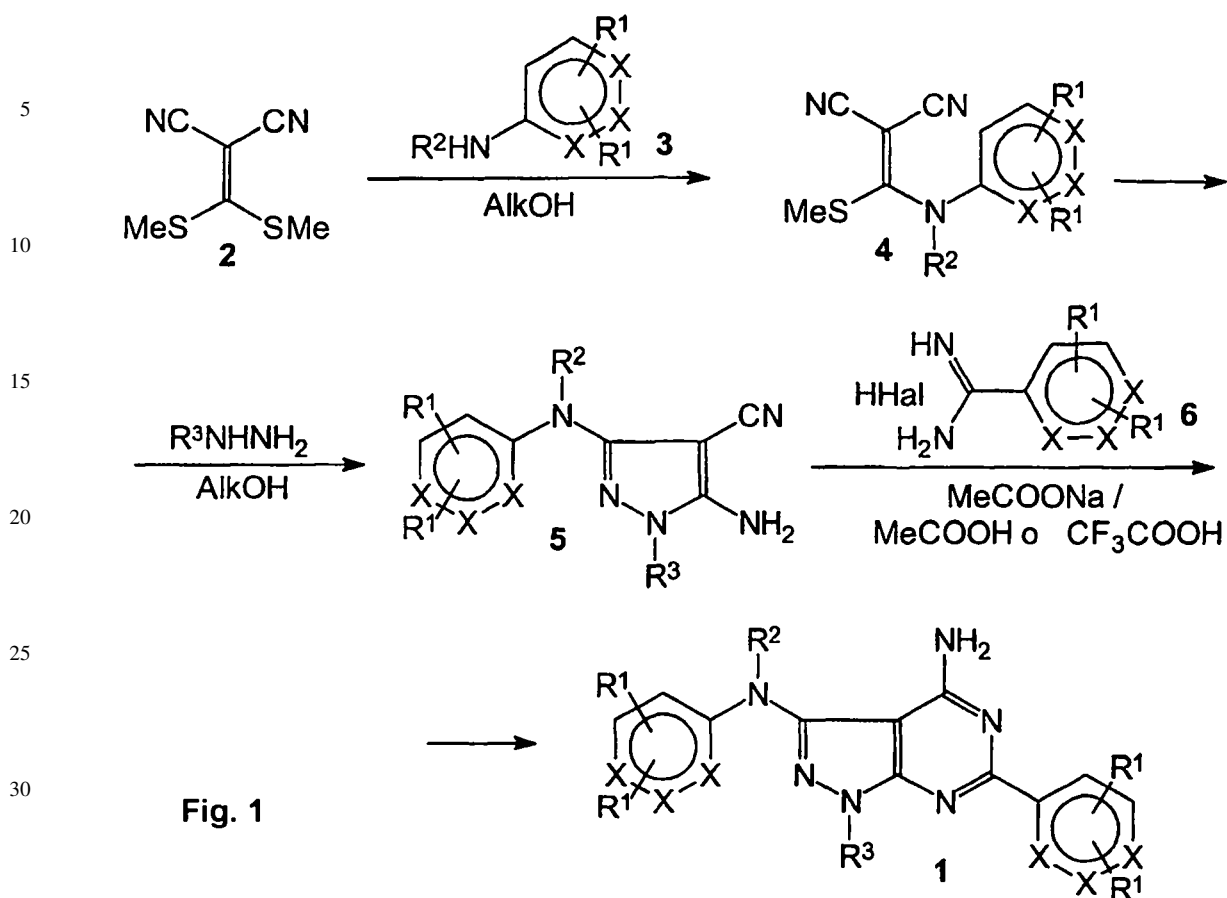
Sorprendentemente, los compuestos de la presente invención demuestran una actividad antiviral muy elevada contra los picornavirus, especialmente contra los enterovirus y rinovirus en el rango de concentración nanomolecular y micromolecular.

Por esta razón, las preparaciones farmacéuticas según la invención que comprenden un compuesto según la fórmula (I) son especialmente aptas para el tratamiento de infecciones respiratorias, de meningitis aséptica, encefalitis, herpangina, etc. de seres humanos y animales que pueden ser provocadas por los picornavirus, en particular por los enterovirus y rinovirus.

La invención se describe más detalladamente a través de métodos de síntesis, derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina según la fórmula general (I) y su efecto y aplicación contra infecciones con picornavirus.

55 La figura 1 muestra un esquema para la síntesis de una pirazol[3,4-d]pirimidina 1 según la invención y comprende, en el primer paso, la condensación de [bis(metiltio)metilen]malononitrilo 2 con arilaminos 3 en alcohol para convertirse en derivados de arilo 4. Éstos pueden aislarse por separado y purificarse para reacciones adicionales o usarse directamente, sin más purificación (reacción "one-pot"). El siguiente paso es la interacción del derivado de arilo 4 con hidrazina o derivados de hidrazina. La reacción se consigue bajo ebullición durante 1 a 4 horas y produce un alto rendimiento de pirazol 5. El paso decisivo de la síntesis de pirazol[3,4-d]pirimidina 1 consiste en la condensación del pirazol 5 con arilamidinas 6 en presencia de ácido acético, ácido trifluoroacético o acetato de sodio.

65



Otro método alternativo para la síntesis consiste en la reacción "one-pot" de malononitrilo con arilisotiocianatos en presencia de hidrato de sodio y el posterior tratamiento de la mezcla de reacción con yodometilo o sulfato de dimetilo. Al mismo tiempo, se forman cantidades elevadas de enaminas. También en este caso, la condensación de pirazol 5 con las arilaminas 6 en presencia de ácido, como ácido acético, ácido trifluoroacético o sus sales (acetato) es el paso de síntesis primordial para la producción de pirazol[3,4-d]pirimidina 1.

En los siguientes ejemplos se indican compuestos especiales de la fórmula general (I) que se utilizan de forma preferida para aplicaciones aptas contra infecciones con picornavirus (sin limitar la invención a ellas), preparando los compuestos según la invención en una solución o una suspensión con un medio farmacéuticamente aceptable, acuoso, orgánico o acuoso-orgánico para su aplicación local o parenteral mediante inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular o para su administración intranasal, o formándola en forma de comprimido, cápsula o en una suspensión acuosa con un soporte convencional para la administración oral o como supositorio.

Los compuestos presentados de la fórmula (I) pueden utilizarse en dosificaciones de 0,1 a 1000 mg/kg peso.

1. Producción y análisis de los derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina

El conocimiento de la estructura de los compuestos según la invención se reveló mediante la forma de síntesis, análisis elementales, NMR y espectroscopia en masa.

Materiales iniciales

Los 5-amino-4-ciano-3-arilaminopirazoles se sintetizaron según el método ilustrado en la figura 1 y la descripción de Tominaga Y *et al.* (J. Heterocycl. Chem., 1990, 27, 775-779). Las arilaminas se sintetizan según el estado de la técnica conocido de los compuestos iniciales de ciano (Boere, RT *et al.*: J. Organomet. Chem., 1987, 331, 161-167; Garigipati RS: Tetrahedron Lett., 1990, 31, 1969-1978; Dann O *et al.*: Justus Liebigs Ann. Chem., 1982, 1836-1839).

ES 2 359 677 T3

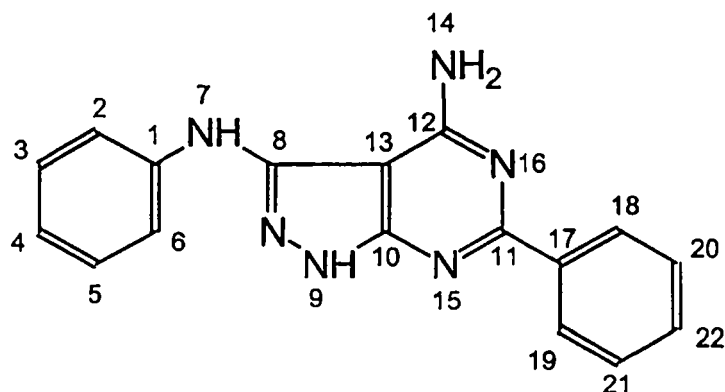
Ejemplo 1

4-amino-3-fenilamino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina

5 Removiendo se añaden 2,3 g (11,5 mmol) de 5-amino-4-ciano-3-fenilaminopirazol, 3,0 g (17,24 mmol) de hidrato de hidrocloreto de benzamidina y 2,2 g (23,0 mmol) de acetato de sodio. Se calienta la mezcla de reacción durante 30 min a 220°C. El material resultante se trata con 50 ml de agua, se filtra y luego se lavan 20 ml de metanol frío y 20 ml de éster frío. El producto se purifica mediante cristalización de DMF/agua.

10 Sustancia amarilla clara, firme, cristalina. Rendimiento 57%. mp 253-5°C.

R_f (cloroformo-metanol; 10/1) - 0,8 (gel de sílice 60). MS m/z 302 (M⁺).



15
20
25
30
¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12,38 (1H, s, NH(9)), 8,32-8,36 (2H, q, CH(18), CH(19)), 8,23 (1H, br. s, NH(7)), 7,67 (2H, d, CH(2), CH(6)), 7,48 (2H, br. s, NH₂), 7,42 (3H, m, CH(20), CH(21), CH(22)), 7,12 (2H, d, CH(3), CH(5)) y 6,98 (1H, m, CH(4)) ppm.

35
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 161,0 (0(11)), 156,2 (C(12)), 153,0 (C(10)), 144,2 (C(8)), 138,3 (C(17)), 136,0 (C(1)), 130,3 (C(4)), 129,8 (C(22)), 128,8 (C(3), C(5)), 128,0 y 127,7 (C(18), C(19)), 120,4 (C(4)), 120,2 (C(2), C(6)), 88,7 (C(13)) ppm.

40 **Calculado para C₁₇H₁₄N₆:** C, 67,54; H, 4,67; N, 27,80

Encontrado: C, 67,61; H, 4,82; N, 27,79

45 Ejemplo 2

4-amino-3-(3-fluorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina

50 La preparación se llevó a cabo según el ejemplo 1.

Sustancia amarilla clara, firme, cristalina. Rendimiento 46%. mp 267-9°C.

R_f (cloroformo-metanol; 10/1) - 0,85 (gel de sílice 60).

55 MS m/z 320 (M⁺).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12,61 (1H, s, NH(9)), 8,35-8,38 (2H, q, CH(18), CH(19)), 8,64 (1H, br. s, NH(7)), 7,46 (2H, br. s, NH₂), 7,3-7,52 (6H, m, CH(2), CH(4), CH(6), CH(20), CH(21), CH(22)), 6,60 (1H, t, CH(5)) ppm.

60
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 166,2 y 161,2 (C(3)), 162,2 (C(11)), 161,8 (C(10)), 156,1 (C(12)), 144,3 (C(1)), 143,4 (C(8)), 130,0 (C(17)), 129,8 (C(5)), 128,5 (C(22)), 127,0 (C(18), C(19)), 112,5 (C(6)), 105,5 y 105,8 (C(2)), 102,6 y 103,9 (C(4)), 89,39 (C(13)) ppm.

65 **Calculado para C₁₇H₁₄FN₆:** C, 63,74; H, 4,09; N, 26,24

Encontrado: C, 63,60; H, 4,02; N, 27,99

ES 2 359 677 T3

Ejemplo 3

4-amino-3-(3-metilfenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina

5 La preparación se llevó a cabo según el ejemplo 1.

Sustancia casi blanca, firme, cristalina. Rendimiento 73%. mp 246-8°C.

10 R_f (cloroformo-metanol; 10/1) - 0,90 (gel de sílice 60).

MS m/z 316 (M^+).

15 1H NMR (DMSO- d_6) δ 12,38 (1H, s, NH(9)), 8,32-8,36 (2H, q, CH(18), CH(19)), 8,23 (1H, br. s, NH(7)), 7,42-7,67 (6H, m, NH₂, CH(6), CH(20), CH(21), CH(22)), 7,21-7,29 (2H, m, CH(2), CH(5)) y 6,42 (1H, d, CH(4)), 2,17 (3H, s, CH₃) ppm.

Calculado para $C_{18}H_{16}N_6$: C, 68,34; H, 5,10; N, 26,56

20 Encontrado: C, 68,43; H, 5,16; N, 26,71

Ejemplo 4

4-amino-3-(4-metilfenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina

La preparación se llevó a cabo según el ejemplo 1.

30 Los parámetros fisicoquímicos son:

Sustancia casi blanca, firme, cristalina. Rendimiento 43%. mp 266-8°C.

R_f (cloroformo-metanol; 10/1) - 0,85 (gel de sílice 60).

35 MS m/z 316 (M^+).

40 1H NMR (DMSO- d_6) δ 12,38 (1H, s, NH(9)), 8,33-8,38 (2H, q, CH(18), CH(19)), 8,15 (1H, br. s, NH(7)), 7,60 (2H, d, CH(2), CH(6)), 7,48 (2H, br. s, NH₂), 7,42 (3H, m, CH(20), CH(21), CH(22)), 6,84 (2H, d, CH(3), CH(5)) y 2,34 (3H, s, CH₃) ppm.

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 161,0 (C(11)), 156,2 (C(12)), 153,0 (C(10)), 144,2 (C(8)), 138,3 (C(17)), 136,0 (C(1)), 130,3 (C(4)), 129,8 (C(22)), 128,0 y 127,7 (C(18), C(19)), 123,8 (C(3), C(5)), 118,2 (C(2), C(6)), 88,9(C(13)), 20,8 (CH₃) ppm.

45 Calculado para $C_{18}H_{16}N_6$: C, 68,34; H, 5,10; N, 26,56

Encontrado: C, 68,38; H, 5,07; N, 26,47

Ejemplo 5

4-amino-3-(4-bromofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina

55 Removiendo se añaden a una solución de 1,0 g (3,6 mmol) de 5-amino-4-ciano-3-(4-bromofenil)aminopirazol, 20 ml de ácido acético, 1,87 g (10,7 mmol) de hidrato de hidrocloreto de benzamidina, 0,89 g (10,7 mmol) de acetato de sodio.

60 La mezcla de reacción se llevó a ebullición durante 4 horas, se trató con 50 ml de agua, se filtró y luego se lavó con 20 ml de metanol frío y 20 ml de éster frío. El producto crudo se purificó mediante cristalización de etanol. Los parámetros fisicoquímicos son:

Sustancia amarilla, cristalina, firme, Rendimiento 38% mp 272-4°C.

65 R_f (cloroformo-metanol; 10/1) - 0,9 (gel de sílice 60).

MS m/z 381 (M^+).

ES 2 359 677 T3

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12,44 (1H, s, NH(9)), 8,33-8,38 (2H, q, CH(18), CH(19)), 8,12 (1H, br. s, NH(7)), 7,40-7,53 (7H, m, NH₂, CH(3), CH(5), CH(20), CH(21), CH(22)), 7,10 (2H, d, CH(2), CH(6)) ppm.

5 **Calculado para: C₁₇H₁₃BrN₆: C, 53,65; H, 3,44; N, 22,04**

Encontrado: C, 53,80; H, 3,48; N, 21,95

10 Ejemplo 6

4-amino-3-(4-fluorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina

15 La síntesis se llevó a cabo según el ejemplo 5, usando como diluyente ácido trifluoroacético. La cristalización del producto final se consiguió mediante etanol/DMF.

Los parámetros fisicoquímicos son:

20 Sustancia amarilla-blanca, cristalina, firme, Rendimiento 58% mp 259-263°C.

R_f (cloroformo-metanol; 10/1) - 0,8 (gel de sílice 60).

MS m/z 320 (M⁺).

25 ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12,69 (1H, s, NH(9)), 8,33-8,41 (4H, m, CH(2), CH(6), CH(18), CH(19)), 8,18 (1H, br. s, NH(7)), 7,58-65 (5H, m, NH₂, CH(20), CH(21), CH(22)), 7,27-7,31 (2H, m, CH(3), CH(5)) ppm.

30 **Calculado para C₁₇H₁₄ F N₆: C, 63,74; H, 4,09; N, 26,24**

Encontrado: C, 63,57; H, 4,07; N, 26,33

35 2. Uso de los derivados de 4-amino-3-amilamino-6-amilpirazol[3,4-d]pirimidina como agentes antivirales

2.1 Tolerancia de los compuestos de los ejemplos arriba mencionados del 1 al 6 en el cultivo celular

40 Se sembraron 1x10⁴ células *HeLa* (DSMZ, ACC 57) en 0,2 ml de medio de cultivo RPMI 1640. Las placas de microtitulación se incubaron sin sustancia de prueba según el estándar (a 37°C, 5% CO₂ y aprox. 95% de humedad relativa) durante 48 horas bajo condiciones fisiológicas para generar monocapas subconfluentes. Después, a las monocapas se añadieron los niveles de dilución de las sustancias de prueba y se incubaron bajo condiciones fisiológicas durante 72 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se midió la extinción de todas las cavidades de la placa de microtitulación, después de la fijación de glutaraldehído y coloración de azul de metileno, a 660 nm con un lector de placas de microtitulación (Sunrise, TECAN) y se determinó la CC₅₀ mediante el programa de evaluación "Magellan".
45 Debido a que la preincubación de las células *HeLa* ya forma un estrato de células, la citólisis durante la incubación posterior con la sustancia de prueba es crucial para la evaluación.

50 Las células GMK se sembraron en las placas de microtitulación y se pre-incubaron durante 48 horas en la incubadora a 5% CO₂, 37°C y 95% de humedad relativa para generar un estrato celular (Schmidtke M *et al.*: J Virol Meth, 2001, 95(1-2), 133-143). Después, el medio se quitó y las sustancias se aplicaron en diferentes concentraciones (100 Pl/pocillo/concentración, factor de dilución 2) sobre el medio de cultivo. Para la determinación del valor de control (seis controles de células sin tratar) se utilizaron 100 Pl de medio por cada prueba. 72 horas después de la aplicación de la sustancia e incubación se procedió a la coloración de las células con cristal violeta/metanol. Después de eluir el colorante, se midió la densidad óptica (DO) de cada cavidad mediante un fotómetro para placas de la empresa Dynatech (550/630 nm) y se comparó con el valor medio de los controles de células. El valor medio de los controles se estimó como el 100%. Mediante las curvas dosificación-efecto se calculó, a través de la interpolación lineal, la concentración citotóxica del 50% (CC₅₀).
55

60

65

Ejemplos**50 % de concentración citotóxica (1,4 ml) en**

5

10

15

	células HeLa	células GMK
1	39,6	>50
2	45,7	>50
3	27,7	no se examinó
4	>50	>50
5	8,5	42,9
6	44,3	>50

2.2 Efecto antiviral de los compuestos de los ejemplos arriba mencionados del 1 al 6 en el cultivo celular

20

Prueba de inhibición del efecto citopático (ecp) con la cepa de referencia internacional coxsackievirus B3 Nancy (CVB3 Nancy), rinovirus humano 2 y 8 (HRV2 y HRV14) en células HeLa

25

30

35

La replicación de los virus usados para la prueba lleva a la destrucción completa de las células huésped, un efecto citopático (ecp) muy fuerte. Con la adición de las sustancias antivirales efectivas (100 PI/pocillo/concentración, factor de dilución 2) el ecp inducido por el virus se inhibió de forma precisa (Schmidtke M. *et al.*: J Virol Meth, 2001, 95 (1-2), 133-143). Para la prueba se infectaron estratos de células sin tratar y tratados con la sustancia con una dosis de virus que llegó 24 horas (CVB3 Nancy) y 72 horas (HRV2 y HRV8) después de la infección con un ecp completo en los controles de virus sin tratar. En este momento, las células adherentes que quedaban, se fijaron y se colorearon con una solución de cristal violeta/formalina. La inhibición del ecp inducido por virus se cuantificó después de eluirlo con colorante de forma fotométrica en un lector de placas Dynatech. El cálculo del efecto antiviral se llevó a cabo mediante la comparación de las densidades ópticas de las células infectadas con el virus tratadas con la sustancia o sin tratar y de la densidad media óptica de los controles de células, que se determinó como el 100%. Mediante las curvas de dosis-efecto medias, se determinó la concentración de inhibición del 50%. Como sustancia de control se utilizó pleconaril. Los resultados obtenidos con las sustancias de los ejemplos se muestran en la siguiente tabla.

Ejemplos**Concentración de inhibición del 50 % (1,4 ml)**

40

45

50

55

	CVB3 Nancy	HRV2	HRV8
Pleconaril	sin efecto	0,01 sin	1,3
1	0,002	efecto	sin efecto
2	0,001	4,1	4,6
3	0,02	1,1	1,0
4	0,08	1,8	2,2
5	0,04	0,7	1,0
6	0,03	0,9	2,0

60

Prueba de reducción de placa (PRT) con la sustancia del ejemplo 1 y coxsackievirus B1, B2, B4, B5, B6 (CVB1, CVB2, CVB4, CVB5, CVB6)

65

Para la realización de la pruebas se infectaron los estratos de células HeLa después de dos a tres días en las placas de cultivo de tejido de 12 pocillos con 50 a 80 unidades formadoras de placas (PFU) (Schmidtke M *et al.*: J Virol Meth, 2001, 95(1-2), 133-143). Dos cavidades no infectadas de la placa sirvieron como control de células (ZK). Después de una absorción del virus durante 1 hora a 37°C, se succionó el exceso con contenido vírico. Las células infectadas se estratificaron con un medio de prueba con 0,4% de agar sin (controles de virus) o con sustancia en concentraciones no citotóxicas (factor de dilución 2, doble determinación por cada concentración) y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Después de la fijación y coloración de las placas con cristal violeta y formalina se eliminó el agar y se enjuagó

ES 2 359 677 T3

bajo agua corriente. El número de las placas inducidas por virus se contó con una caja de luz para luego calcular la reducción porcentual de placas causada por la sustancia. Se llevaron a cabo tres aproximaciones de prueba iguales para calcular, mediante la curva dosis-efecto media ya calculada, la concentración que llevó a una reducción de placas del 50%. Los resultados obtenidos con la sustancia del ejemplo 1 se muestran en la siguiente tabla.

Virus	50 % concentración citotóxica de las células HeLa (CC ₅₀) en µg/ml	50 % concentración inhibidora en las células HeLa (IC ₅₀) en µg/ml	Índice de selección (SI) = CC ₅₀ :10 ₅₀
CVB1	39,6	12,7	3,1
CVB2	39,6	0,3	132
CVB4	39,6	7,1	5,6
CVB5	39,6	2,8	14,1
CVB6	39,6	2,6	15,3

2.3 Toxicidad aguda y subaguda de los compuestos de los ejemplos 2 al 4 en un ratón

La toxicidad *aguda* de las sustancias de los ejemplos 2 a 4 se determinó en ratones de 4 a 5 semanas de edad (sin designación de la variedad). Se utilizó una solución de 1% de carboximetilcelulosa acuosa añadiendo 1 a 2 gotas de TWIN-80 para preparar la suspensión de la sustancia. Se administraron a 5 ratones en una única dosis oral 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 o 5000 mg/kg de las sustancias obtenidas de los ejemplos 2 a 4. En los tres días siguientes se observó el estado de salud general de los ratones, cambios de peso, la temperatura rectal y la tasa de supervivencia.

Hasta una concentración de sustancia de 3000 mg/kg, todos los animales sobrevivieron después de la administración única de las sustancias de los ejemplos 2 a 4 (véase la tabla abajo). No se vieron afectados ni la condición general, ni la temperatura rectal o el peso.

La dosis letal del 50% de las dos sustancias se encontraba alrededor de 3500 mg/kg (cálculo según Kärber en Mayer *et al.* Virologische Arbeitsmethoden, Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1973). Después de la aplicación de una dosis de 5000 mg/kg, los animales murieron en las siguientes 3 a 5 horas.

	Concentración (mg/kg)	Número de ratones muertos/supervivientes	
		Ejemplo 2	Ejemplo 4
	1500	0/5	0/5
	2000	0/5	0/5
	2500	0/5	0/5
	3000	0/5	0/5
	4000	3/5	4/5
	5000	5/5	5/5

ES 2 359 677 T3

En base a estos resultados las sustancias de los ejemplos 2 y 4 se pueden considerar como muy aceptables si se suministran por vía oral una única vez.

La toxicidad *subaguda* de las mismas sustancias (ejemplos 2 a 4) se determinó en ratones de cuatro semanas de edad (sin designación de variedad). Se utilizó una solución de 1% de carboximetilcelulosa acuosa añadiendo 1 a 2 gotas de TWIN-80 para preparar las suspensiones de sustancia. Se administró 100 mg/kg de las sustancias de los ejemplos 2 a 4 a 7 ratones, una vez por día y durante 5 días de forma peroral. La observación duró un periodo de 10 días. Cada día, se evaluaron la condición general, las diferencias de peso, los cambios en la temperatura rectal y la tasa de supervivencia así como, al final de la prueba, los cambios morfológicos en secciones del bazo, pulmón e hígado.

El tratamiento de la sustancia no influyó sobre la condición general y la temperatura corporal. El peso aumentó durante el periodo de observación, como en los animales no tratados de control. No se murió ningún animal.

Las sustancias de los ejemplos 2 y 4 se mostraron, en una concentración de 100 mg/kg y administración peroral 5 veces como muy aceptables.

Enumeración de los símbolos de referencia utilizados

- 1- pirazol[3,4-d]pirimidina
- 2- [bis(metil)metileno]malononitrilo
- 3- arilamina
- 4- derivado de arilo
- 5- pirazol
- 6- arilamidina

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se ha elaborado únicamente como ayuda para el lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha puesto mucha atención en la compilación de las mismas no se puede evitar incurrir en errores u omisiones, declinando la OEP toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 674642 A [0006]
- US 2965643 A [0006]
- EP 691128 A [0006]
- US 3600389 A [0006]
- EP 496617 A [0006]
- WO 0043394 A [0008]
- US 4904666 A [0006]

Literatura no patente citada en la descripción

- Melnick J *et al.* *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, 1996, 655-712 [0002]
- Couch RB *et al.* *Fields Virology*. Lippincott-Raven, 1996, 713-35 [0002]
- Rotbart HA. *Antiviral Res*, 2002, vol. 53 (2), 83-98 [0002] [0003]
- Crotty S *et al.* *Nat Med*, 2000, vol. 6 (12), 1375-9 [0003]
- Heinz BA; Vance LM. *J Virol*, 1995, vol. 69 (7), 4189-97 [0003]
- Miller FD *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1985, vol. 27 (1), 102-6 [0003]
- Pattick AK *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, vol. 43 (10), 2444-50 [0004]
- Diana GD. *Curr Med Chem*, 2003, vol. 2, 1-12 [0005]
- Pevear DC *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, vol. 43 (9), 2109-15 [0005]

ES 2 359 677 T3

- **McKinlay** MA *et al. Annu Rev Microbiol*, 1992, vol. 46, 635-54 [0005]
- **Ledford** RM *et al. J Virol*, 2004, vol. 78 (7), 3663-74 [0005]
- 5 • **Groarke** JM *et al. J Infect Dis*, 1999, vol. 179 (6), 1538-41 [0005]
- **Abzug** MJ *et al. Pediatr Infect Dis J*, 2003, vol. 22, 335-41 [0005]
- **Hayden** FG *et al. Antivir Ther*, 2002, vol. 7, 53-65 [0005]
- 10 • **Hayden** FG *et al. Clin Infect Dis*, 2003, vol. 36, 1523-32 [0005]
- *J. Heterocyc. Chem.*, 1982, vol. 19, 1565 [0006]
- 15 • von **Tominaga** Y *et al. J. Heterocycl. Chem.*, 1990, vol. 27, 775-779 [0023]
- **Boere**, RT *et al. J. Organomet. Chem.*, 1987, vol. 331, 161-167 [0023]
- **Garigipati** RS. *Tetrahedron Lett.*, 1990, vol. 31, 1969-1978 [0023]
- 20 • **Dann** O *et al. Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1982, 1836-1839 [0023]
- **Schmidtke** M *et al. J Virol Meth*, 2001, vol. 95 (1-2), 133-143 [0039] [0041]
- 25 • **Schmidtke** M. *et al. J Virol Meth*, 2001, vol. 95 (1-2), 133-143 [0040]

30

35

40

45

50

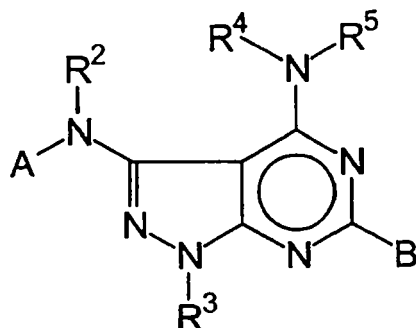
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Derivados de 4-amino-3-aryl-amino-6-aryl-pirazol[3,4-d]pirimidina, **caracterizado** por un compuesto según la fórmula general I,



(I)

en la que:

- los grupos A y B son, independientemente entre sí, fenilo, naftilo, piridilo, quinolilo, pirazinilo, pirazolilo, triacínilo, imidazolilo, furanilo, tienilo, y en el que en cada uno de los grupos anteriormente mencionados e independientemente el uno del otro se puede sustituir de uno a tres átomos de hidrógeno por el residuo R¹ que se determina a continuación,
- el residuo R¹ puede ser NO₂, CN, CONR₂², COOR², CHO, CONH₂, un halógeno, un radical alifático saturado o insaturado, lineal o ramificado con 1 a 7 elementos de cadena, un radical alcanol saturado o insaturado, lineal o ramificado con 1 a 8 elementos de cadena, OR², SR², NR₂², SO₂NR₃², un di-fluorometilo o trifluorometilo, un fenilo,
- los residuos R², R³, R⁴, R⁵ que pueden ser, independientemente, H, un radical alifático saturado o insaturado, halogenado o no halogenado, lineal o ramificado con 1 a 7 elementos de cadena, bencilo, fenilo o naftilo, un ciclo monoheterógeno o poliheterógeno saturado o insaturado con los átomos heterogéneos N, S, O, y en el que cada uno de los grupos anteriormente mencionados puede sustituirse, de forma independiente, con flúor, cloro, bromo, trifluorometilo, alquilo, alcoxilo, ciano, nitro, amino, aminoalquilo, C(O)-alquilo, C(O)O-alquilo, bencilo, fenilo o naftilo.

2. Derivados de 4-amino-3-aryl-amino-6-aryl-pirazol[3,4-d]pirimidina según la reivindicación 1, **caracterizado** por una 4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina según la fórmula general I, donde el residuo R¹ en los grupos A y B, independientemente el uno del otro, está formado por CONH₂, CN, halógeno, NO₂ y CF₃, respectivamente.

3. Derivados de 4-amino-3-aryl-amino-6-aryl-pirazol[3,4-d]pirimidina según la reivindicación 1, **caracterizado** por una 1-R³-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina según la fórmula general I, donde el residuo R¹ en los grupos A y B, independientemente el uno del otro, están formados por CONH₂, CN, halógeno, NO₂ y CF₃, respectivamente.

4. Derivados de 4-amino-3-aryl-amino-6-aryl-pirazol[3,4-d]pirimidina según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que éstos se seleccionan del grupo de las 6-fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidinas, comprendiendo:

- 4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina,
- 4-amino-6-(tri-R¹)fenil-3-fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina,
- 1-alquilo-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina,
- 4-amino-1,6-di(tri-R¹)fenil-3-fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina,
- 4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilalquiloaminopirazol[3,4-d]pirimidina,
- 1-alquilo-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilalquiloaminopirazol[3,4-d]pirimidina.

ES 2 359 677 T3

5. Derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que éstos se seleccionan del grupo de 6-fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina, en el que el residuo R¹ en los grupos A y B, independientemente el uno del otro, está formado por un halógeno.

5 6. Derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que éstos se seleccionan del grupo de 6-fenilaminopirazol[3,4-d]pirimidina, comprendiendo:

4-amino-3-(3-fluorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

10 4-amino-3-(3-fluorofenil)amino-6-(4-clorofenil)pirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(3-cloro)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

15 4-amino-3-(3-metoxi)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(4-fluorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(4-fluorofenil)amino-6-(4-clorofenil)pirazol[3,4-d]pirimidina,

20 4-amino-3-(4-clorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(3-fluorofenil)amino-1-metil-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina,

25 4-amino-1-bencil-3-(3-fluorofenil)amino-6-fenilpirazol[3,4-d]pirimidina.

7. Método para producir derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina según la reivindicación 1, **caracterizado** por la condensación de pirazol con ariloamidinas en presencia de ácido (ácido acético, ácido trifluoroacético) o de sus sales (acetato).

30 8. Uso de los derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina según una de las reivindicaciones 1 a 6 o de sus sales farmacéuticamente aceptables para producir un medicamento con acción biológica.

35 9. Uso según la reivindicación 8, **caracterizado** por el hecho de que la acción biológica es al mismo tiempo una acción antiviral.

10. Uso según la reivindicación 9, **caracterizado** por el hecho de que el medicamento se utiliza para la aplicación profiláctica y terapéutica contra infecciones virales.

40 11. Uso según la reivindicación 10, **caracterizado** por el hecho de que las infecciones virales son infecciones con el picornavirus.

45 12. Uso según una de las reivindicaciones 8 a 11, **caracterizado** por el hecho de que los derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina se utilizan como sustancia única.

50 13. Uso según una de las reivindicaciones 8 a 11, **caracterizado** por el hecho de que los derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazol[3,4-d]pirimidina se utilizan junto con otros agentes, especialmente con medicamentos conocidos.

50

55

60

65