



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0713488-6 B1



(22) Data do Depósito: 20/06/2007

(45) Data de Concessão: 12/04/2022

(54) Título: DERIVADOS DE 4-AMINO-3-ARILAMINO-6-ARILPIRAZOLO[3,4D]PIRIMIDINA

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

(30) Prioridade Unionista: 22/06/2006 DE 10 2006 029 074.7.

(73) Titular(es): DRITTE PATENTPORTFOLIO BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. KG.

(72) Inventor(es): VADIM MAKAROV; PETER WUTZLER; MICHAELA SCHMIDTKE; HANS-MARTIN DAHSE.

(86) Pedido PCT: PCT DE2007001104 de 20/06/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/147401 de 27/12/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/12/2008

(57) Resumo: DERIVADOS DE 4-AMINO-3-ARILAMINO-6-ARILPIRAZOLO[3,4-D]PIRIMIDINA, PROCESSOS PARA A SUA PREPARAÇÃO E SEU USO COMO SUBSTÂNCIAS ATIVAS ANTIVIRAIS. A invenção refere-se a derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazolo[3,4-d] pirimidina, processos para a sua preparação e seu uso como substâncias ativas antivirais. O objetivo foi produzir novos compostos, os quais podem ser usados como substâncias ativas, por exemplo, para o tratamento de infecções por picornavírus e evitem os problemas de medicamentos conhecidos, especialmente com respeito à resistência e intolerância. Esse objetivo é resolvido por compostos da fórmula geral I.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"DERIVADOS DE 4-AMINO-3-ARILAMINO-6-ARILPIRAZOLO[3,4-D]PIRIMIDINA".

[0001] A invenção refere-se a modernos derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazolo[3,4-d]pirimidina, processos para a sua preparação e seu uso como substâncias ativas antivirais, preferivelmente para o tratamento de infecções pelo picornavírus.

[0002] Picornavírus, especialmente entero- e rinovírus, são responsáveis por um amplo espectro de doenças no ser humano. Mais de 60 diferentes sorotipos patógenos humanos pertencem aos enterovírus (Melnick J em: Fields B et al., editors. Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996, 655-712). Infecções A e B por enterovírus, echovírus, coxsackievírus decorrem muitas vezes com febre inespecífica e provocam doenças do trato respiratório superior, que muitas vezes não se distinguem de infecções por rinovírus. A conjuntivite hemorrágica, herpangina, doença de mão-pé-boca, meningite asséptica, encefalite e miocardite aguda fazem parte dos sintomas mais graves, que também podem ocorrer de forma epidêmica. Nesse caso, diferentes tipos de vírus podem causar sintomas iguais ou um tipo de vírus, sintomas muito diferentes. Com a introdução de métodos modernos e sensitivos no diagnóstico do vírus, obteve-se a comprovação de RNA enteroviral persistente, bem como de proteínas de vírus em relação com doenças crônicas, tais como, por exemplo, do diabetes tipo II, poliomiosite e principalmente da miocardite crônica. Infecções por enterovírus persistentes também ocorrem em pacientes com agamaglobulinemia e manifestam-se, nesse caso, como meningoencefalite por enterovírus persistente. Como sintomas concomitantes ocorreram freqüentemente uma dermatomiosite ou polimiosite. Cerca de 100 sorotipos são incluídos nos rinovírus. Infecções por rinovírus provocam mais da metade de todas as doenças respiratórias do trato respiratório superior no ser humano

(Couch RB em: Fields BM et al., editors: Fields Virology, 3ª edição. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 713-35). Em um período médio de evolução da doença de cerca de 10 dias, esses resfriados de evolução geralmente inofensiva, levam anualmente a milhares de consultas médicas, a faltas no trabalho e escola. Como complicações podem ocorrer uma otite média, sinusite, exacerbação de asma e fibrose cística, bem como infecções do trato respiratório inferior, principalmente em bebês, pacientes mais idosos e pacientes imunossuprimidos. Atualmente, com base na multiplicidade de tipos, não é possível uma profilaxia com vacina. Rino- e enterovírus provocam anualmente enormes custos condicionados pelas faltas ao trabalho, consultas médicas e medicamentos associados a essas doenças. Até agora, o tratamento dessas infecções por vírus é efetuado em relação ao sintoma, pois não há terapêuticos à disposição específicos para vírus (Rotbart HA: *Antiviral Res.* 2002, 53(2), 83-98). Além disso, freqüentemente são receitados antibióticos inúteis. Por isso, o desenvolvimento de novos virustáticos é absolutamente necessário.

[0003] Os resultados da intensa busca por possibilidades de tratamento de infecções por enterovírus e rinovírus foram reunidos por Rotbart 2002 em um artigo sinótico (Rotbart HA: *Antiviral Res* 2002, 53(2), 83-98). Por exemplo, a ribavirina inibe uma enzima da célula hospedeira, a 5'-monofosfato de inosina (IMP)-desidrogenase. Através do desligamento dessa enzima-chave para a síntese de nucleotídeos de purina, a replicação de picornavírus pode ser inibida *in vitro* e *in vivo*. Além disso, a ribavirina deve ser diretamente incorporada no genoma de poliovírus e, com isso, agir adicionalmente como mutagênico para vírus de RNA (Crotty S et al.: *Nat Med*, 2000, 6(12), 1375-9). Devido a fortes efeitos colaterais, esses compostos não são utilizados para o tratamento de infecções por rino- e enterovírus.

[0004] Alvos específicos para a inibição da síntese viral do RNA

representam o genoma em si, a polimerase de RNA dependente do RNA viral, bem como outras proteínas virais necessárias para o complexo de replicação. Guanidinas, tiossemicarbazonas, benzimidazóis, dipiridamóis e flavonas são conhecidas há muito tempo como inibidores das polimerases de diferentes picornavírus na cultura celular. Com esses, obtiveram-se êxitos muito diferentes *in vivo*. Como candidato mais promissor com ampla atividade anti-enterovírus e antirrinovírus valem derivados de enviroxima. Enviroxima impede a síntese de filamento múltiplo através da ligação à proteína do vírus 3A, a qual é necessária para a formação de intermediários de RNA no crescimento do vírus (Heinz BA und Vance LM: *J Virol*, 1995, 69(7), 4189-97). Em estudos clínicos verificaram-se efeitos terapêuticos moderados ou nenhum, uma má farmacocinética e efeitos colaterais indesejáveis (Miller FD et al.: *Antimicrob Agents Chemother*, 1985, 27(1), 102-6). Até agora, não há dados clínicos de derivados mais modernos com melhor biodisponibilidade e tolerância.

[0005] Com base no conhecimento da fina estrutura e função da protease viral 2C, desenvolveu-se o inibidor de protease AG 7088. AG 7088 atua na cultura celular na faixa de concentração nanomolecular contra 48 tipos de rinovírus bem como coxsackievírus A21, B3, enterovírus 70 e echovírus 11 (Pattick AK et al.: *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(1), 2444-50). Até agora, não se conhecem os dados definitivos dos estudos clínicos.

[0006] Com o esclarecimento da estrutura molecular dos capsídeos virais, criaram-se as condições prévias para um projeto intencional de bloqueadores de capsídeos, as "substâncias WIN" (Diana GD: *Curr Med Chem* 2003, 2, 1-12). Elas impedem a adsorção e/ou o descobrimento (uncoating) de rino- e enterovírus. Algumas das substâncias WIN atuam de modo altamente específico somente contra alguns gêneros ou tipos de vírus dos picornavírus. Outros derivados inibem o crescimento de rino-

como também de enterovírus. Às substâncias WIN pertencem, por exemplo, arildone, disoxaril e pirodavir. Esses compostos mostram efeitos antivirais muito bons na cultura celular. Uma má solubilidade (arildone), baixa biodisponibilidade (arildone e disoxaril), rápida metabolização e separação (disoxaril e WIN 54954), bem como efeitos colaterais, tais como, por exemplo, exantema (WIN 54954), impossibilitam uma aplicação clínica. Há grandes esperanças no pleconaril, um outro bloqueador de capsídeo. Pleconaril possui uma biodisponibilidade oral muito boa e após sua ligação na bolsa hidrófoba no capsídeo do vírus, ele inibe a penetração de rino-, echo- e coxsackievírus (Pevear DC et al.: *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43(9), 2109-15; McKinlay MA et al.: *Annu Rev Microbiol* 1992, 46, 635-54), Com isso, este é potencialmente eficaz contra um amplo espectro de doenças por vírus, desde o resfriado comum até a meningite viral ou miocardite. Foram observadas resistências nos rinovírus, enterovírus 71 e coxsackievírus B3 (Ledford RM et al.: *J. Virol.* 2004, 78(7), 3663-74; Groarke JM et al.: *J. Infect Dis* 1999, 179(6), 1538-41). Estudos clínicos em crianças e adultos com uma meningite por enterovírus (Abzug MJ et al.: *Pediatr Infect Dis J*, 2003, 22, 335-41), bem como infecções respiratórias provocadas por rinovírus (Hayden FG et al.: *Antivir Ther*, 2002, 7, 53-65; Hayden FG et al.: *Clin Infect Dis*, 2003, 36, 1523-32) evoluiu positivamente. O efeito terapêutico detectado, contudo, não foi suficiente para a autorização de pleconaril (Picovir, Viropharma, EUA) para o tratamento de infecções por rinovírus nos EUA. Em março de 2002 um pedido correspondente foi indeferido pelo órgão governamental dos Estados Unidos da América para o controle de alimentos e medicamentos (Food and Drug Administration: FDA) devido ao baixo êxito de terapia com efeitos colaterais simultaneamente detectados.

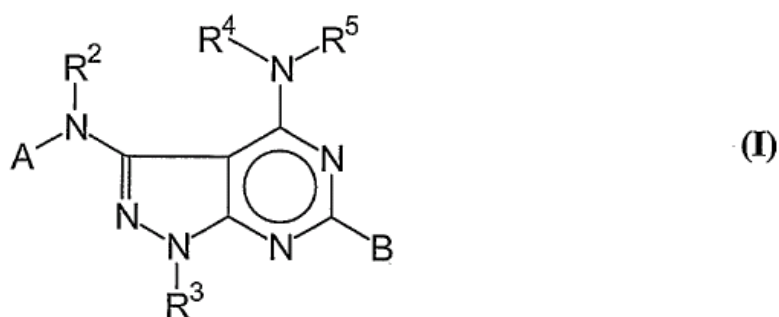
[0007] Também são descritas pirazolpirimidinas como antagonistas de CRF (por exemplo, EP 674.642 e EP 691.128), que inibem, por

exemplo, a adenosina cinase (EP 496.617 ou US 4.904.666), a xantinaoxigenase (J. Heterocycl. Chem. 19, 1565, 1982) ou outros sistemas enzimáticos (US 2.965.643 e US 3.600.389).

[0008] Dessa maneira, além disso, um objetivo urgente da pesquisa antiviral consiste no desenvolvimento de virustáticos altamente eficazes para o tratamento de doenças por rino- e enterovírus. Os novos compostos devem ser bem toleráveis e vencer as resistências existentes, por exemplo, contra pleconaril.

[0009] O objetivo da invenção é indicar novos compostos bem como sua preparação e uso, que sejam utilizáveis como substâncias ativas antivirais contra enterovírus e rinovírus, bem como evitar as desvantagens indicadas do estado da técnica, especialmente os problemas com respeito à resistência e intolerância dos respectivos medicamentos.

[00010] De acordo com a invenção, esse objetivo é resolvido por derivados de 4-amino-3-amilamino-6-amilpirazolo[3,4-d]pirimidina especificamente substituídos da fórmula geral I, inclusive seus compostos de sal farmaceuticamente toleráveis,



em que:

- os grupos A e B independentes uns dos outros, são fenila, naftila, piridila, quinolila, pirazinila, pirimidila, pirazolila, triazinila, imidazolila, furanila, tienila, sendo que em cada um dos grupos mencionados acima, independentes uns dos outros, um ou três átomos de hidrogênio podem ser substituídos pelo radical R¹ designado a seguir,
- o radical R¹ pode ser NO₂, CN, CONR², COOR², CHO,

CONH₂, um halogênio, um radical alifático, linear ou ramificado, saturado ou insaturado com 1-7 membros de cadeia, um radical alcanol linear ou ramificado, saturado ou insaturado com 1-8 membros de cadeia, OR², SR², NR²₂, SO₂NR³₂, di- ou trifluormetila, fenila,

- os radicais R², R³, R⁴, R⁵ independentes uns dos outros, podem ser H, um radical alifático, linear ou ramificado, halogenado ou não halogenado, saturado ou insaturado com 1-7 membros de cadeia, benzila, fenila ou naftila, um mono- ou poli-heterociclo, saturado ou insaturado com os heteroátomos N, S, O, sendo que cada um dos grupos mencionados acima, independentes uns dos outros, pode ser substituído com flúor, cloro, bromo, trifluormetila, alquila, alcóxi, ciano, nitro, amino, aminoalquila, C(O)-alquila, C(O)O-alquila, benzila, fenila ou naftila.

[00011] Nas sub-reivindicações, são mostradas concretizações vantajosas dos derivados de 4-amino-3-amilamino-6-amilpirazolo[3,4-d]pirimidina especificamente substituídos, bem como processos para sua preparação e possibilidades de aplicação, sem limitar a invenção respectivamente às mesmas.

[00012] Em uma concretização preferida, a invenção refere-se aos compostos da fórmula geral (I), selecionados do grupo das 6-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidinas, compreendendo:

4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
 4-amino-6-3-(tri-R¹)fenil-3-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
 1-alquil-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
 4-amino-1,6-di(tri-R¹)fenil-3-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
 4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilalquilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
 1-alquil-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilalquilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina.

[00013] De maneira vantajosa, a invenção inclui também 6-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidinas da fórmula geral (I),

compreendendo:

4-amino-3-(3-fluorfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(3-fluorfenil)amino-6-(4-clorofenil)pirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(3-cloro)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(3-metoxi)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(4-fluorfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(4-fluorfenil)amino-6-(4-clorofenil)pirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(4-clorofenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(3-fluorfenil)amino-1-metil-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-1-benzil-3-(3-fluorfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina.

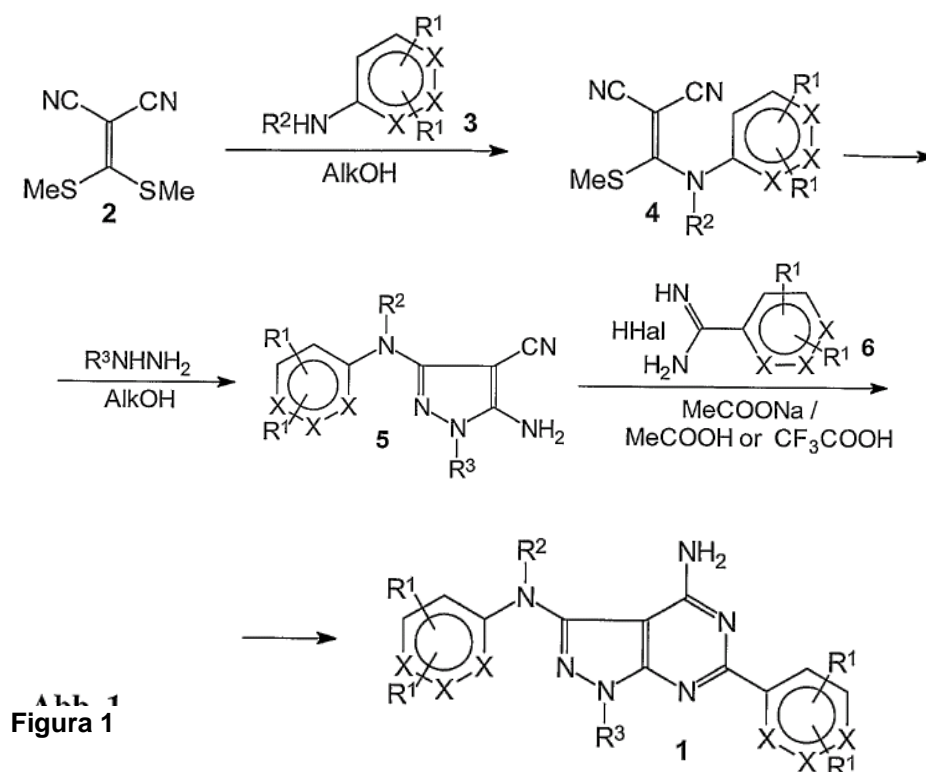
[00014] Surpreendentemente, os compostos da presente invenção mostram uma forte atividade antiviral contra picornavírus, especialmente entero- e rinovírus na faixa de concentração nano- ou micromolar.

[00015] Por isso, as preparações farmacêuticas de acordo com a invenção, que contêm um composto da fórmula (I), são particularmente adequadas para o tratamento de infecções respiratórias, da meningite asséptica, da encefalite, herpangina e outras no ser humano e animal, que podem ser provocadas por picornavírus, especialmente entero- e rinovírus.

[00016] A seguir, a invenção deve ser detalhadamente ilustrada com base em processos de síntese, derivados especiais de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazolo[3,4-d]pirimidina da fórmula geral (I), bem como seu efeito e aplicação contra infecções por picornavírus.

[00017] A figura 1 mostra um esquema geral para a síntese de pirazolo[3,4-d]pirimidina 1 de acordo com a invenção e no primeiro estágio inclui a condensação de [bis(metiltio)metilen]malononitrila 2 com arilaminas 3 em álcool para derivados de arila 4. Os últimos podem ser em cada caso isolados e purificados para outras reações ou usados diretamente sem purificação para a reação subsequente (reação "one-pot"). O estágio subsequente consiste na interação do

derivado de arila 4 com hidrazina ou derivados de hidrazina. A reação decorre com fervura durante 1 a 4 horas e leva a um alto rendimento de pirazol 5. O estágio decisivo da síntese de pirazolo[3,4-d]pirimidina 1 consiste na condensação do pirazol 5 com arilamidinas 6 na presença de ácido acético, ácido trifluoracético ou acetato de sódio.



[00018] Um método de síntese alternativo consiste na reação "one-pot" de malononitrila com aril isotiocianatos na presença de hidreto de sódio e um tratamento seguinte da mistura de reação com iodometila ou dimetilsulfato. Nesse caso, formam-se grandes quantidades de enaminas. Também aqui, novamente a condensação de pirazol 5 com arilamidinas 6 na presença de ácido, tal como ácido acético ou ácido trifluoracético ou seus sais (acetato), é o estágio de síntese decisivo para a preparação de pirazolo[3,4-d]pirimidina 1.

[00019] Nos exemplos seguintes, são listados compostos especiais da fórmula geral (I), os quais são preferivelmente adequados para aplicações contra infecções por picornavírus (sem limitar a invenção aos mesmos), sendo que os compostos de acordo com a invenção,

podem ser preparados em uma solução ou em uma suspensão em um meio aquoso, orgânico ou aquoso-orgânico farmacologicamente aceitável para a aplicação local ou parenteral, através de injeção intravenosa, subcutânea ou intramuscular ou para a administração intranasal ou eles são formados na forma de um comprimido, cápsula ou suspensão aquosa com excipiente convencional para a administração oral ou como supositório.

[00020] Nesse caso, os compostos apresentados da fórmula (I) podem ser usados em dosagens de 0,1 a 1000 mg/kg de peso corporal.

1. Preparação e Análise dos Derivados de 4-amino-3-amilamino-6-amilpirazolo[3,4-d]pirimidina

[00021] O esclarecimento da estrutura dos compostos de acordo com a invenção, foi efetuado através do tipo da síntese, análises elementares, espectros de ressonância magnética e de massa.

Materiais de Partida:

[00022] Os 5-amino-4-ciano-3-amilaminopirazóis foram sintetizados de acordo com o processo representado na figura 1, bem como pela descrição de Tominaga Y et al. (*J. Heterocycl. Chem.*, 1990, 27, 775-779). Arilamidinas são sintetizadas de acordo com o conhecido estado da técnica a partir dos compostos de partida de ciano correspondentes (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).

Exemplo 1: 4-amino-3-fenilamino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina

[00023] 3,0 g (17,24 mmols) de hidrato de cloridrato de benzamidina são acrescentados sob agitação a 2,3 g (11,5 mmols) de 5-amino-4-ciano-3-fenilaminopirazol e 2,2 g (23,0 mmols) de acetato de sódio. A mistura de reação é aquecida por 30 minutos a 220°C. O material resultante é tratado com 50 ml de água, filtrado e lavado com 20 ml de metanol frio, bem como 20 ml de éster frio. O produto é

purificado de DMF/água por meio de cristalização.

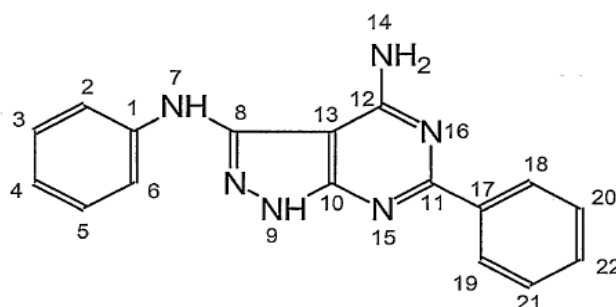
Substância cristalina sólida, amarela-clara.

Rendimento 57 %.

Ponto de fusão 253-5°C

R_f (clorofórmio - metanol; 10/1) - 0,8 (sílica-gel 60).

MS m/z 302 (M⁺).



RMN-¹H (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)) e 6,98 (1H, m, CH(4)) ppm.

RMN-¹³C (DMSO-d₆) 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)), 128,8 (C(3), C(5)), 128,0 e 127,7 C(18), C(19)).120,4 (C(4)), 120,2 (C(2), C(6)), 88,7 (C(13)) ppm.

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

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

Exemplo 2: 4-amino-3-(3-fluorfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina [00024] A preparação foi efetuada tal como descrito no exemplo 1.

Substância cristalina sólida, amarela-clara.

Rendimento 46 %.

Ponto de Fusão 267-9°C

R_f (clorofórmio - metanol; 10/1) - 0,85 (sílica-gel 60).

MS m/z 320 (M⁺).

RMN-¹H (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.

RMN-¹³C (DMSO-d₆) δ 166,2 e 161,12 (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 e 105,8 (C(2)), 102,6 e 103,9 (C(4)), 89,39 (C(13)) ppm.

Calculado para C₁₇H₁₄N₆: δ C, 63,74; H, 4,09; N, 26,24

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

Exemplo 3: 4-amino-3-(3-metilfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-]pirimidina [00025] A preparação foi efetuada tal como no exemplo 1.

Substância cristalina sólida, quase branca.

Rendimento 73 %.

Ponto de Fusão 246-8°C.

R_f (clorofórmio - metanol; 10/1) - 0,90 (sílica-gel 60).

MS m/z 316 (M⁺).

RMN-¹H (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)), 7,42-7,67 (6H, m, NH₂, CH(6), CH(20), CH(21), CH(22)), 7,21-7,29 (2H, m, CH(2), CH(5)) e 6,42 (1H, d, CH(4)), 2,17 (3H, s, CH₃) ppm.

Calculado para C₁₈H₁₆N₆: C, 68,34; H, 5,10; N, 26,56

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

Exemplo 4: 4-amino-3-(4-metilfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina [00026] A preparação foi efetuada tal como descrito no exemplo 1.

[00027] Os parâmetros físico-químicos são:

substância cristalina sólida, quase branca. Rendimento 43 %, ponto de fusão 266-8°C.

R_f (clorofórmio - metanol; 10/1) - 0,85 (sílica-gel 60).

MS m/z 316 (M⁺).

RMN-¹H (DMSO-d₆); 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)) e 2,34 (3H, s, CH₃) ppm.

RMN-¹³C (DMSO-d₆) 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 e 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.

Calculado para C₁₈H₁₆N₆: C, 68,34; H, 5,10; N, 26,56

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

Exemplo 5: 4-amino-3-(4-bromofenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina [00028] 1,87 g (10,7 mmols) de hidrato de cloridrato de benzamidina e 0,89 g (10,7 mmols) de acetato de sódio são acrescentados, sob agitação, a uma solução de 1,0 g (3,6 mmols) de 5-amino-4-ciano-3-(4-bromofenil)aminopirazol em 20 ml de ácido acético. A mistura de reação foi fervida por 4 horas, tratada com 50 ml de água, filtrada e lavada com 20 ml de metanol frio bem como com 20 ml de éster frio. O produto bruto foi purificado por meio de cristalização a partir do etanol. Os parâmetros físico-químicos são:

substância sólida, cristalina, amarela, rendimento de 38 %. Ponto de fusão 272-4°C.

R_f (clorofórmio - metanol; 10/1) - 0,9 (sílica-gel 60).

MS m/z 381 (M⁺).

RMN-¹H (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.

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

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

Exemplo 6: 4-amino-3-(4-fluorfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina [00029] A síntese foi efetuada tal como descrito no exemplo 5, sendo utilizado ácido trifluor-acético como solvente. A cristalização do produto final foi efetuada em etanol/DMF.

[00030] Os parâmetros físico-químicos são:

substância sólida, cristalina, branco-amarela, rendimento 58 %. Ponto de fusão 259-263°C.

R_f (clorofórmio - metanol; 10/1) - 0,8 (sílica-gel 60).

MS m/z 320 (M⁺).

RMN-¹H (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, CH(3), CH(5)) ppm.

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

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

2. Uso dos Derivados de 4-amino-3-amilamino-6-amilpirazolo[3,4-]pirimidina de acordo com a Invenção, como Substâncias Ativas Antivirais

2.1 Tolerância dos compostos dos exemplos 1 a 6 mencionados acima na cultura celular:

[00031] Para cada cavidade de placas de microteste foram semeadas 1x10⁴ células HeLa (DSMZ, ACC 57) em 0,2 ml de meio de cultura RPMI 1640. As placas de microtitulação foram incubadas sem substância de teste de acordo com o padrão (a 37°C, 5 % de CO₂) e cerca de 95 % de umidade relativa do ar) por 48 horas em condições fisiológicas, para produzir monocamada subconflente. Em seguida, as monocamadas foram adicionadas a estágios de diluição das substâncias de teste e incubadas por 72 horas em condições fisiológicas. Ao final do tempo de incubação, após fixação com glutaraldeído e tingimento com azul de metileno, a extinção de todas as cavidades das placas de microtitulação foram medidas a 660 nm com um leitor de microplacas (Sunrise, TECAN) e a CC₅₀ foi medido com auxílio do programa de avaliação "Magellan". Visto que a pré-incubação das células HeLa já leva à formação de uma camada de células subconfluentes, a citólise na incubação subsequente com a substância de teste é decisiva para a avaliação.

Células GMK foram semeadas em placas de microtitulação e pré-incubadas na estufa com 5 % de CO₂, 37°C e 95 % de umidade do ar por 48 horas, para formar uma camada de células (Schmidtke M et al.: *J. Virol Meth*, 2001, 95(1-2), 133-143). Em seguida, o meio foi removido e as substâncias aplicadas no meio de cultura em diversas concentrações (100 µl/cavidade/concentração, fator de diluição 2). 100 µl de meio foram usados em cada caso para a determinação do valor de controle (seis controles de células não tratados). 72 horas após a aplicação da substância e incubação, efetuou-se o tingimento das células com cristal violeta/metanol. Após separar o corante, mediu-se a densidade óptica (OD) das cavidades individuais em um fotômetro de placa da firma Dynatech (550/630 nm) e comparou-se com o valor médio dos controles de células. O valor médio dos controles foi assumido como 100 %. Com base nas curvas de efeito de dosagem médias calculou-se a concentração citotóxica de 50 % (CC₅₀) por meio de interpolação linear.

Exemplos	Concentração citotóxica de 50 % (µg/ml) em células HeLa	células GMK
1	39,6	> 50
2	45,7	> 50
3	27,7	não examinadas
4	> 50	> 50
5	8,5	42,9
6	44,3	> 50

2.2 Efeito Antiviral dos Compostos dos Exemplos 1 a 6 Mencionados acima na Cultura Celular:

Teste de Inibição do Efeito Citopático (zpE) com a cepa de referência internacional coxsackievírus B3 Nancy (CVB3 Nancy), rivovírus humano 2 e 8 (HRV2 e HRV14) em células HeLa

[00032] A replicação dos vírus usados no teste levam à completa destruição das células hospedeiras, a um efeito citopático muito

pronunciado (zpE). Através da adição de substâncias de eficácia antiviral (100 µl/cavidade/concentração, fator de diluição 2), o zpE induzido pelos vírus pode ser visadamente inibido (Schmidtke M. et al.: *J. Virol Meth*, 2001, 95(1-2), 133-143). No teste, as camadas de células fechadas não tratadas e tratadas com substância foram infectadas com uma dose de vírus, que 24 horas (CVB3 Nancy) ou 72 horas (HRV2 e HRV8) após a infecção leva a um zpE completo nos controles de vírus não tratados. Neste momento, as células ainda aderentes foram fixadas e tingidas com uma solução de cristal violeta/formalina. A inibição do zpE induzido pelo vírus foi fotometricamente quantificado em um leitor de placa Dyatech após a eluição do corante. O cálculo do efeito antiviral foi efetuado através de uma comparação das densidades ópticas das células infectadas com vírus tratadas com substância e não tratadas com uma densidade óptica média dos controles de células, que foram fixados como 100 %. Com base nas curvas de efeito de dosagem médias determinou-se a concentração inibidora a 50 %. Como substância de controle foi usado pleconaril. Os resultados obtidos com as substâncias do exemplo foram reunidos na seguinte tabela.

Exemplos	Concentração	Inibidora a	50 % (µg/ml)
	CVB3 Nancy	HRV2	HRV8
pleconaril	ineficaz	0,01	1,3
1	0,002	ineficaz	ineficaz
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

Teste de Redução de Placa (PRT) com a Substância do Exemplo 1 e Coxsackievírus B1, B2, B4, B5, B6 (CVB1, CVB2, CVB4, CVB5, CVB6)

[00033] Para a realização do teste, camadas de células HeLa fechadas de três dias em placas de cultura de tecido de 12 cavidades, foram infectadas com 50-80 unidades formadoras de placas (PFU) (Schmidtke M et al.: *J Virol Meth*, 2001, 95(1-2), 133-143). Duas cavidades da placa não infectadas serviram como controle de células (ZK). Após adsorção de uma hora do vírus a 37°C, o sobrenadante contendo vírus foi aspirado. As células infectadas foram sobrepostas com um meio de teste contendo 0,4 % de ágar sem (controles de vírus) ou com substância em concentrações não citotóxicas (fator de diluição 2, determinação dupla por concentração) e incubadas por 48 horas a 37°C. Após a fixação e tingimento das placas com cristal violeta-formalina, o ágar foi removido e estas lavadas sob água corrente. O número de placas induzidas pelo vírus foi contado por meio de uma caixa de luz e, em seguida, calculada a redução percentual da placa condicionada pela substância. Foram realizados três preparados de ensaio iguais e com base na curva média de efeito de dosagem, calculou-se a concentração, que levou a uma redução de 50 % da placa (IC₅₀). Os resultados obtidos com a substância do exemplo 1 foram reunidos na seguinte tabela.

Vírus	50 % de citotóxica a 50 % concentração	Concentração em inibidora	Índice de seleção (SI) = CC ₅₀ :IC ₅₀
	Células HeLa (CC ₅₀) em µg/ml	Células HeLa (IC ₅₀) em µg/ml	
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 Toxicidade aguda e subaguda dos compostos dos exemplos 2 e 4 no camundongo

[00034] A toxicidade aguda das substâncias dos exemplos 2 e 4 foi determinada em camundongos de 4-5 semanas de vida (sem designação da cepa). Uma solução aquosa de carboximetilcelulose a 1 % com adição de 1-2 gotas de TWIN-80 foi usada, para preparar uma suspensão de substâncias. A cada 5 camundongos foram administrados uma vez oralmente 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 ou 5000 mg/kg das substâncias dos exemplos 2 e 4. Nos 3 dias subsequentes verificou-se o estado geral dos camundongos, alterações de peso, a temperatura retal e a taxa de sobrevivida.

[00035] Todos os animais sobreviveram até uma concentração da substância de 3000 mg/kg com administração única das substâncias dos exemplos 2 e 4 (vide tabela abaixo). Nem o estado geral, nem a temperatura retal ou o peso corporal foi influenciado.

[00036] A dose letal de 50 % das duas substâncias era de aproximadamente 3500 mg/kg (cálculo de acordo com Kärber em Mayer et al. Virologische Arbeitsmethoden, Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1973). Após aplicação da dosagem dos 5000 mg/kg os animais morreram dentro de 3 a 5 horas.

Concentração (mg/kg)	Número de mortos/sobreviventes Camundongos	
	Exemplo 2	Exemplo 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

[00037] Com base nesses resultados, as substâncias dos exemplos 2 e 4 com aplicação oral única, são avaliadas como sendo muito bem toleráveis.

[00038] A toxicidade subaguda das mesmas substâncias (exemplos 2 e 4) foi determinada em camundongos com idade de quatro semanas

(sem designação da cepa). Uma solução de carboximetilcelulose aquosa a 1 % adicionada de 1-2 gotas de TWIN-80 foi usada, para preparar suspensões de substâncias. A cada 7 camundongos foram administrados, por via peroral, 100 mg/kg das substâncias dos exemplos 2 e 4, uma vez ao dia durante 5 dias. O período de observação importou em 10 dias. Diariamente, foram avaliados o estado geral, diferenças no peso corporal, alterações na temperatura retal e a taxa de sobrevivência, bem como, no final do ensaio, após dissecação, as alterações morfológicas do baço, pulmão e fígado.

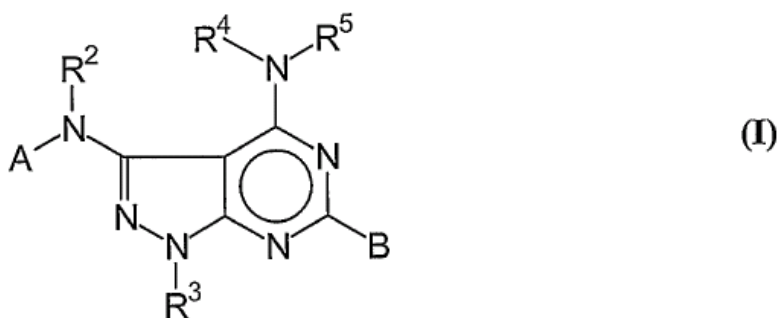
[00039] O tratamento com a substância não teve nenhuma influência sobre o estado geral, bem como a temperatura corporal. O peso corporal aumentou no período de observação, tal como nos animais de controle não tratados. Nenhum dos animais morreu. Dessa maneira, as substâncias dos exemplos 2 e 4 em uma concentração de 100 mg/kg com administração oral quádrupla, comprovaram-se como sendo muito bem toleráveis.

Listagem dos Símbolos de Referência Utilizados

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

REIVINDICAÇÕES

1. Derivados de 4-amino-3-amilamino-6-amilpirazolo[3,4-d]pirimidina, caracterizados por um composto da fórmula geral I



na qual:

- os grupos A e B independentes uns dos outros, são fenila, naftila, piridila, quinolila, pirazinila, pirimidila, pirazolila, triazinila, imidazolila, furanila, tienila, sendo que em cada um dos grupos mencionados acima, independentes uns dos outros, um ou três átomos de hidrogênio podem ser substituídos pelo radical R¹ designado a seguir,

- o radical R¹ pode ser NO₂, CN, CONR², COOR², CHO, CONH₂, um halogênio, um radical alifático, linear ou ramificado, saturado ou insaturado com 1-7 membros de cadeia, um radical álcool linear ou ramificado, saturado ou insaturado com 1-8 membros de cadeia, OR², SR², NR²₂, SO₂NR³₂, di- ou trifluormetila, fenila,

- os radicais R², R³, R⁴, R⁵ independentes uns dos outros, são H, um radical alifático, linear ou ramificado, halogenado ou não halogenado, saturado ou insaturado com 1-7 membros de cadeia, benzila, fenila ou naftila, um mono-heterociclo, saturado ou insaturado com os heteroátomos N, S, O.

2. Derivados de 4-amino-3-amilamino-6-amilpirazolo[3,4-d]pirimidina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por uma 4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina do composto geral I, em que o radical R¹ nos grupos A e B, independente

um do outro, é formado por CONH₂, CN, halogênio, NO₂ ou CF₃.

3. Derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazolo[3,4-d]pirimidina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por uma 1-R³-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina do composto geral I, em que o radical R¹ nos grupos A e B, independente um do outro, é formado por CONH₂, CN, halogênio, NO₂ ou CF₃.

4. Derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazolo[3,4-d]pirimidina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que estes são selecionados do grupo das 6-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidinas, compreendendo:

4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-6-(tri-R¹)fenil-3-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
1-alkil-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-1,6-di(tri-R¹)fenil-3-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilalkilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina,
1-alkil-4-amino-6-fenil-3-(tri-R¹)fenilalkilaminopirazolo[3,4-d]pirimidina.

5. Derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazolo[3,4-d]pirimidina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que estes são selecionados do grupo das 6-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidinas, em que o radical R¹ nos grupos A e B independente um do outro é formado por um halogênio.

6. Derivados de 4-amino-3-arilamino-6-arilpirazolo[3,4-d]pirimidina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que estes são selecionados do grupo das 6-fenilaminopirazolo[3,4-d]pirimidinas, compreendendo:

4-amino-3-(3-fluorfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(3-fluorfenil)amino-6-(4-clorofenil)-pirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(3-cloro)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(3-metoxi)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,

4-amino-3-(4-fluorfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(4-fluorfenil)amino-6-(4-clorofenil)pirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(4-clorofenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-3-(3-fluorfenil)amino-1-metil-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina,
4-amino-1-benzil-3-(3-fluorfenil)amino-6-fenilpirazolo[3,4-d]pirimidina.