



Int. Cl.: e07D // A 61K

**437599**

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un<sup>a</sup>

### PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY.

RESIDENCIA: 307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS,

Indiana, Estados Unidos.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE

COMPUESTOS 3-(5-NITROIMIDAZOL-2-IL)

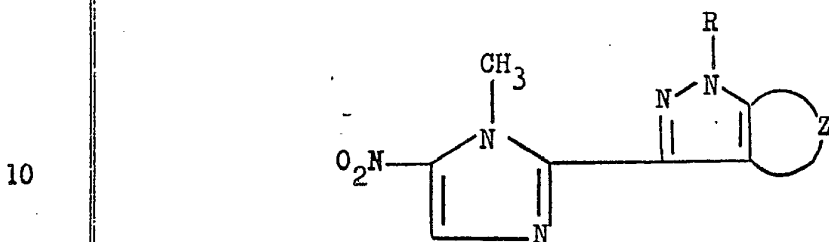
PIRAZOLO [3,4-d] PIRIMIDINA.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 469.256 del 13.5.74  
545.852 31.1.75



1           Esta invención se refiere a un procedimiento para la  
 5           preparación de compuestos de 3-(5-nitroimidazol-2-il)pirazolo[3,4-d]pirimidina. Los compuestos son útiles como agen-  
 tes antibacterianos y antiprotozoarios.

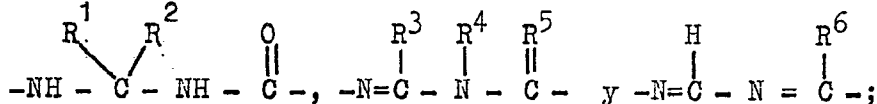
5           La invención proporciona un procedimiento para la  
 preparación de un nuevo compuesto de fórmula:



Fórmula I

donde

15           Z está seleccionado entre el grupo formado por



R es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

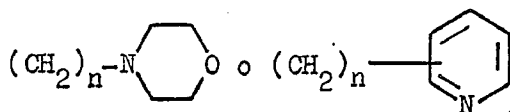
R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>X;

20           R<sup>2</sup> es -O -  $\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$  - CH<sub>2</sub>X;

X es bromo, cloro, flúor o yodo;

R<sup>3</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o CF<sub>3</sub>;

25           R<sup>4</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)<sub>2</sub>,  
 CH<sub>2</sub>CH[O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)]<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH, 9-octadecenilo,



R<sup>5</sup> es NH u oxígeno;

30



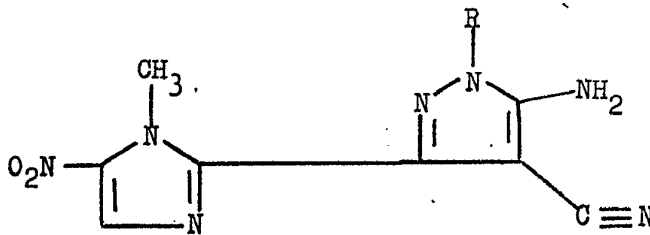
1

$R^6$  es  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHCOCH}_3$ ,  $\text{NHCHCO}_2\text{H}$  o  $\text{NHNH}_2$ ;  
 $R^7$  es hidrógeno o  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ;  
 $n$  es 1, 2, 3 o 4;

5

y sus sales no tóxicas y farmacológicamente aceptables; por reacción de un compuesto de fórmula:

10

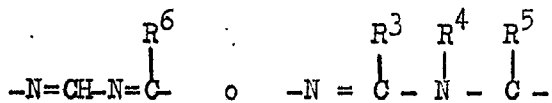


Fórmula II

donde R es el definido en la Fórmula I, con (a) un ácido orgánico, un anhídrido orgánico o un anhídrido cloroacético o

15

(b) cuando Z es

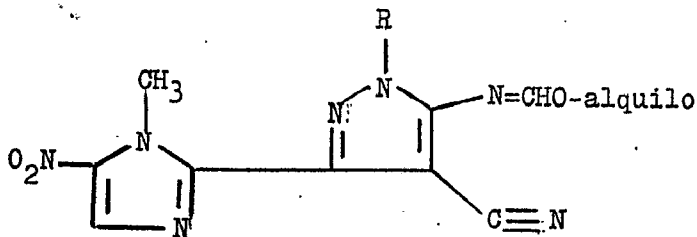


donde  $R^3$  es hidrógeno,  $R^4$  es distinto de hidrógeno,  $R^5$  es  $\text{NH}$  y  $R^6$  es el definido anteriormente; hacer reaccionar el com-

20

puesto de Fórmula II con ortoformiato de trialquilo para formar un compuesto de fórmula:

25



Fórmula III

donde alquilo es alquilo  $\text{C}_1-\text{C}_3$  y después hacer reaccionar un compuesto de Fórmula III con una amina primaria orgánica.

30

Se han llevado a cabo muchas investigaciones para po-



1 ner a punto agentes para el control de las bacterias y los  
protozoos. Así, han sido objeto de amplios estudios los com-  
puestos y los métodos de control de Escherichia coli,  
5 Pasteurella multocida, Salmonella typhimurium, T. vaginalis  
y organismos similares.

En la técnica anterior, la patente británica número  
1.326.360, publicada el 8 de Agosto de 1973, describe las  
5-nitro-furil-pirazol sustituido-pirimidinonas, métodos pa-  
ra preparación de estos compuestos y medicamentos que los  
10 contienen como ingrediente activo. Según se afirma, los com-  
puestos poseen actividad como agentes antibacterianos, anti-  
helmínticos, antiprotozoarios, coccidiostáticos, antimalá-  
ricos, tripanicidas y antimicoplasmáticos.

Asimismo, en la técnica anterior se encuentra la pa-  
15 tente estadounidense 3.711.495 (16 de Enero de 1973) que  
describe los isoxazalin-3-il-5-nitroimidazoles sustituidos  
y métodos para su preparación. Se indica que los compuestos  
son activos como agentes tricomonacidas y antitripanosomiá-  
ticos.

20 Además, en la técnica anterior se encuentra la paten-  
te alemana nº 2.218.717, también identificada como Derwent  
nº 74757T, que describe derivados 5-nitrofurílicos sustituidos  
de aminopirazolopirimidinas y métodos para su preparación.  
Se indica que los compuestos poseen actividad coccidiostáti-  
ca, tripanocida, antibacteriana, antimicótica, antimicoplás-  
mica, antihelmíntica, antiprotozoaria y antimalárica, con  
25 amplio espectro y toxicidad muy baja. Los compuestos inclui-  
dos están ilustrados por la 4-amino-1-metil-3-(5-nitro-2-  
30 furil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.

Otra referencia de la técnica anterior es la patente



1975

1 estadounidense 3.772.294 (13 de Noviembre de 1973) que se  
 dirige a un procedimiento para la preparación de 1-pirazo-  
 lo [3,4-d] pirimidinas 4-mono-sustituídas o 4,6-disustituídas.  
 Se indica que estos compuestos son útiles en el tratamiento  
 5 de la gota.

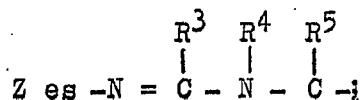
Otra referencia de la técnica anterior es la patente  
 estadounidense 3.755.324 (28 de Agosto de 1973) que está di-  
 rigida a compuestos de la clase de la 3-(5-nitro-2-furil)-  
 1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4(5H)ona, alegándose que posee  
 10 propiedades antimicrobianas y es útil para el tratamiento de  
 las infecciones del tracto urinario en los mamíferos.

Todavía otra referencia de la técnica anterior es la  
 patente británica nº 1.353.892, publicada el 22 de Mayo de  
 1974 y dirigida a las microimidazolil-triazolopiridazinas,  
 15 de las que se afirma que son activas como agentes antimicro-  
 bianos tanto in vitro como in vivo, especialmente contra  
Trichomonades y Salmonella.

Los compuestos descritos en la técnica anterior cita-  
 da difieren significativamente en su estructura de los de  
 20 esta solicitud.

Los compuestos de esta invención son activos como  
 agentes antibacterianos y antiprotozoarios. Son activos con-  
 tra varios organismos, tales como Escherichia coli,  
 25 Pasteurella multocida, Salmonella typhimurium, Mycoplasma  
hyopneumoniae, Mycoplasma synoviae, Treponema hyodysenteriae  
 y Trichomonas vaginalis.

Los compuestos más preferidos son aquellos donde

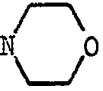


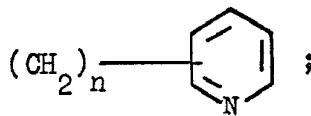
30



1 R es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o haloalqui  
lo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

R<sup>3</sup> es hidrógeno;

5 R<sup>4</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N  o.



R<sup>5</sup> es NH u oxígeno;

10 n es 1, 2, 3 o 4;

y sus sales no tóxicas y farmacológicamente aceptables.

En la fórmula anterior, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> representa un radical hidrocarbonado saturado, de cadena lineal o ramificada, como metilo, etilo, n-propilo o isopropilo.

15 Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> representa un radical hidrocarbonado saturado, de cadena lineal o ramificada, como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo o tero-butilo.

20 Hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> es hidroximetilo, hidroxietilo, o hidroxipropilo.

Haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> es halometilo, haloetilo o halopropilo.

Halo es bromo, cloro, flúor o yodo.

25 Los compuestos de Fórmula I presentan actividad in vitro contra el siguiente grupo de microorganismos, muchos de los cuales son importantes patógenos de los animales:

Pseudomonas

Escherichia coli

Salmonella

30 Pasteurella multocida



1975

1 (ganado vacuno)

(pavos)

Bordetella

Streptococcus

5 Staphylococcus

Mycoplasma hyorhinis

Mycoplasma synoviae

Mycoplasma hyosynoviae

Mycoplasma gallisepticum

10 Vibrio coli

Mycoplasma hyopneumoniae

Klebsiella pneumoniae

Aerobacter aerogenes

Erwinia amylovora

15 Proteus morganii

Trichomonas vaginalis

Treponema hyodysenteriae.

Los compuestos de Fórmula I son sintetizados fácilmente utilizando 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo.

Así, la síntesis de algunos de los compuestos, por

ejemplo, aquellos donde Z es  $-N = \overset{R^3}{\underset{|}{C}} - \overset{R^4}{\underset{|}{N}} - \overset{R^5}{\overset{||}{C}} -$ , donde  $R^3 =$   
 $R^4 =$  hidrógeno y  $R^5 =$  oxígeno, se lleva a cabo calentando,

25 es decir refluendo, una mezcla de 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo y un ácido orgánico adecuado, como ácido fórmico, durante un periodo de tiempo suficiente para completar la reacción. Este periodo de tiempo varía entre unas 2 horas y unas 24 horas. Después de calentar a reflujo durante el periodo de tiempo re-

30

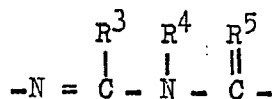


1 querido, se enfría la mezcla producto de reacción y el disolvente se separa a vacío dejando un residuo. Este último se  
recristaliza en un disolvente adecuado para dar el producto  
deseado. Los disolventes adecuados para la recristalización  
5 son dimetilformamida, etanol absoluto comercial y similares.

Este procedimiento general es ilustrado más específicamente en lo que sigue.

Se calienta a reflujo una mezcla de 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo y  
10 ácido fórmico, adecuadamente ácido fórmico al 90 % y se continúa refluendo durante unas 2 horas. Se enfría la mezcla producto de reacción y el disolvente se separa a vacío para dejar un residuo. Este último se recristaliza en un disolvente adecuado, en este caso dimetilformamida, para dar un  
15 producto con un punto de fusión de 291-292°C aproximadamente, identificado por análisis elemental y espectro RMN como 1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona.

20 La síntesis de otro de los compuestos, por ejemplo aquéllos donde Z en la fórmula genérica es



donde R<sup>3</sup> es distinto de hidrógeno, R<sup>4</sup> es hidrógeno y R<sup>5</sup> es oxígeno, se realiza calentando y refluendo una mezcla del  
25 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo intermedio con un anhídrido de un ácido orgánico adecuado, tal como anhídrido propiónico o anhídrido trifluoracético.

30 Así, por ejemplo, se calienta a reflujo, es decir se calienta a la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción,





10 MAY 1975

1 carbonitrilo para formar el éster.

Todavía otros compuestos, en especial aquellos donde Z en la fórmula genérica es



donde R<sup>3</sup> es hidrógeno, R<sup>4</sup> es distinto de hidrógeno y R<sup>5</sup> es NH, son sintetizados dejando que el compuesto intermedio identificado como N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo (siendo preparado este producto intermedio como se describe más adelante en esta memoria) reaccione con una amina primaria orgánica en un disolvente adecuado, como etanol, durante un periodo de tiempo suficiente para que la reacción sea completa. Las aminas orgánicas primarias adecuadas son etilamina, n-propilamina, dimetiletilendiamina asimétrica, dimetilpropilendiamina asimétrica, dietiletildiamina asimétrica, 4-piridilmetilamina, N-(2-aminoetil)morfolina y similares. El tiempo de reacción varía entre unos 10 minutos y unas 24 horas, según la naturaleza y la identidad de las sustancias reaccionantes. La temperatura de reacción varía entre la temperatura ambiente y la de reflujo, es decir, la temperatura de ebullición de la mezcla de reacción. Una vez terminado el periodo de reacción, la mezcla producto se enfría y filtra y el sólido que se obtiene se recristaliza en un disolvente adecuado, como dimetilformamida. Esta síntesis es ilustrada en lo que sigue.

20 Una mezcla de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo, n-propilamina y etanol se agita a la temperatura ambiente durante unos 30 minutos. Se filtra la mezcla producto de reacción y el



12 MAY 1975

1 sólido que se obtiene se recristaliza en un disolvente ade-  
cuado, como dimetilformamida. El producto obtenido tiene  
un punto de fusión de unos 239-240°C y es identificado por  
análisis elemental y espectro RMN como 4,5-dihidro-4-imino-  
5 1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-propil-1H-pirazo-  
lo [3,4-d] pirimidina.

La síntesis de los compuestos donde Z en la fórmula  
genérica es



donde R<sup>6</sup> es amino o hidrazino, se realiza en general dejan-  
do que el compuesto intermedio, identificado como N-[4-cia-  
no-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] for-  
mimidato de metilo, reaccione con hidróxido amónico concen-  
15 trado o con hidrazina, respectivamente, en un disolvente co-  
mo etanol, a la temperatura de reflujo de la mezcla, duran-  
te una hora aproximadamente. Después se filtra la mezcla  
producto de reacción y el producto sólido se purifica por  
recristalización. Esta preparación es ilustrada a continua-  
20 ción, donde R<sup>6</sup> en el producto es amino.

Se calienta a reflujo, bajo un condensador de reflujo,  
durante una hora, una mezcla de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-me-  
til-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo  
e hidróxido amónico concentrado en etanol absoluto comercial.  
25 Se filtra la mezcla producto de reacción y el material sólido  
que se obtiene se recristaliza en un disolvente adecuado, en  
este caso dimetilformamida. El producto obtenido tiene un  
punto de fusión de unos 317-318°C (desc.) y es identificado  
por análisis elemental y espectros infrarrojo y RMN como 4-  
30 amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo



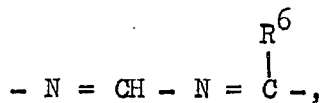
1975

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

[3,4-d]pirimidina.

El derivado acetilado del compuesto anterior se prepara fácilmente dejando a reflujo durante unas 22 horas una mezcla de 4-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina y anhídrido acético. La mezcla de reacción se enfría y filtra. El sólido así obtenido se recristaliza en un disolvente adecuado como dimetilformamida para dar un producto cristalino con un punto de fusión de unos 284-286°C, producto que es identificado por análisis elemental y espectro RMN como N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il] acetamida.

El compuesto donde Z en la fórmula genérica es

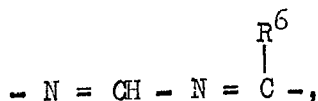


y R<sup>6</sup> es -NHCH<sub>2</sub>COOH, se prepara calentando a reflujo una mezcla de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo, glicina y carbonato sódico en un disolvente constituido por volúmenes iguales de etanol y agua y refluendo la mezcla durante hora y media aproximadamente. Después la mezcla producto de reacción se enfría y filtra. El material sólido así obtenido se purifica disolviéndolo en agua caliente y después enfriando y acidulando empleando un ácido fuerte tal como ácido sulfúrico concentrado, ácido clorhídrico concentrado, ácido bromhídrico concentrado o ácido fosfórico concentrado. La acidulación provoca la precipitación de un sólido gris azulado. Este último se separa por filtración y se recristaliza en dimetilformamida para dar un producto con un punto de fusión de unos 240-241°C. El producto es identificado por análisis elemental y espectro RMN como N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimi-



1 dazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il] glicina.

El compuesto donde Z en la fórmula genérica es



5 y R<sup>6</sup> es  $-\text{NHCHCOOH}$   $\begin{matrix} | \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3 \end{matrix}$ , se prepara calentando una mezcla de

N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo y metionina, siguiendo el mismo procedimiento general antes descrito para la glicina. El pro-  
10 ducto, con un punto de fusión de unos 207-208°C (desc.), se identifica por análisis elemental y espectro RMN como N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pi-  
rimidin-4-il]metionina.

15 En el caso de los nuevos compuestos donde Z en la fórmula genérica es



donde R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = CH<sub>2</sub>CH(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> y R<sup>5</sup> = NH, la preparación  
20 se lleva a cabo agitando una mezcla de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo, dietilacetal de aminoacetaldehído y etanol absoluto comercial, a la temperatura ambiente, durante unas 2 horas. Transcurrido este tiempo, se filtra la mezcla produ-  
25 to de reacción. El material sólido obtenido se recristaliza en dimetilformamida para dar un producto cristalino con un punto de fusión de unos 160-164°C. El producto se identifica por análisis elemental y espectro RMN como dietilace-  
30 tal de 4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-5(4H)-acetaldehído.

Las sales de adición de ácidos de los compuestos, se



MAY. 1975

1 preparan por métodos muy conocidos por los expertos en este  
campo. La preparación de la sal hidrocioruro, por ejemplo,  
se lleva a cabo generalmente suspendiendo o disolviendo  
la pirazolopirimidina sustituida en éter etílico seco, en-  
5 friando la mezcla a unos 0°C en un baño de hielo y agua y  
haciendo borbotear cloruro de hidrógeno a través de la mez-  
cla durante unos 15 minutos, mientras se mantiene la tempe-  
ratura de la misma a unos 0°C. Transcurrido este tiempo,  
se tapa el matraz que contiene la mezcla producto de reao-  
10 ción y se mantiene a unos 0°C durante una hora aproximada-  
mente. Después se filtra la mezcla para aislar el material  
sólido, que es analíticamente puro y es identificado por el  
punto de fusión, el análisis elemental y el espectro RMN.

15 La preparación de las sales de adición de ácido nítri-  
co, sulfúrico o fosfórico, de estos compuestos se lleva a  
cabo generalmente suspendiendo o disolviendo la pirazolo-  
pirimidina sustituida en un disolvente adecuado, como me-  
tanol y añadiendo gota a gota a la mezcla, con agitación,  
el ácido sulfúrico, nítrico o fosfórico (fosfórico al 85 %),  
20 Después la mezcla se agita a la temperatura ambiente duran-  
te 1 a 3 horas más. Después se filtra la mezcla y el sólido  
que se recoge se lava con metanol. El producto se identifica  
por el punto de fusión, espectro RMN y análisis elemental.  
Pueden prepararse otras sales de adición de ácido empleando  
25 ácidos como el bromhídrico.

30 La preparación del 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-  
2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo intermedio, empleado en  
la síntesis de los compuestos, está descrita en la solicitud  
de patente estadounidense copendiente número de serie  
469.176, presentada el 13 de Mayo de 1974.



2 MAY 1975

1 Este producto intermedio, el 5-amino-1-metil-3-(1-me-  
til-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo, es fácil-  
mente sintetizado partiendo de 2-metil-5-nitroimidazol co-  
mercial. El 2-metil-5-nitroimidazol se deja reaccionar con  
5 un agente alquilante adecuado, como sulfato de dimetilo, en  
un disolvente adecuado, por ejemplo benceno, para formar el  
compuesto identificado como 1,2-dimetil-5-nitroimidazol. Es-  
te último compuesto se deja a su vez reaccionar con benzal-  
dehido en presencia de una base, por ejemplo etóxido sódi-  
co en etanol absoluto, para dar 1-metil-5-nitro-2-estiril-  
imidazol.

10 La siguiente etapa en la síntesis del producto inter-  
medio es la oxidación del ligando estirilo del 1-metil-5-ni-  
tro-2-estirilimidazol. Esta oxidación puede ser realizada  
15 mediante uno cualquiera de los oxidantes adecuados para oxi-  
dar este tipo de ligando al grupo aldehído (formilo).

De acuerdo con un procedimiento, la oxidación puede  
ser efectuada tratando el 1-metil-5-nitro-2-estirilimidazol,  
suspendido en un disolvente adecuado, con ozono, aproximada-  
20 mente a la temperatura ambiente. Los disolventes adecuados  
son metanol, una mezcla de metanol y agua o una mezcla de  
metanol, dicloruro de metileno y agua y similares.

Otro método para oxidar el compuesto estirilico es el  
descrito por Henry y colaboradores, patente estadounidense  
25 3.472.864 (14 de Octubre de 1969). Estos autores describen  
el uso de un sistema oxidante constituido por un peryodato  
de metal alcalino y tetróxido de osmio en un medio disolven-  
te acuoso adecuado, preferiblemente agua y 1,2-dimetoxietano,  
a una temperatura comprendida aproximadamente entre 20 y  
30 35°C, durante un periodo de unas 10 a 20 horas.



1973

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

La próxima etapa en la preparación del compuesto intermedio consiste en dejar que el 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído, preparado como se ha descrito antes, reaccione con una hidrazina sustituida de fórmula  $H_2N-NHR$ , donde R representa alquilo  $C_1-C_3$  o hidroxialquilo  $C_1-C_3$ . La reacción se lleva a cabo en un disolvente adecuado como cloroformo, a la temperatura de reflujo, para dar una alquilhidrazona o alquil(sustituido)hidrazona de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído. Las hidrazinas sustituidas adecuadas para uso en esta reacción son la metilhidrazina, etilhidrazina, n-propilhidrazina, isopropilhidrazina, 2-hidroxiethylhidrazina y similares. Las condiciones de reacción son las mismas para todas las hidrazinas. Así, por ejemplo, cuando se hace reaccionar metilhidrazina con 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído en cloroformo como disolvente, se obtiene metilhidrazona de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído.

La hidrazona formada de esta manera se hace reaccionar a su vez con N-bromosuccinimida, alrededor de la temperatura ambiente, en un disolvente adecuado como cloroformo, para formar la alquilhidrazona o alquil(sustituido)hidrazona de bromuro de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carbonilo. La reacción con N-bromosuccinimida es aplicable a cualquiera de las hidrazonas sustituidas para dar las bromo-hidrazonas sustituidas. Como ejemplo específico, cuando se hace reaccionar metilhidrazona de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído con N-bromosuccinimida a la temperatura ambiente en cloroformo como disolvente, se obtiene metilhidrazona de bromuro de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carbonilo.

Esta bromohidrazona sustituida es inestable y pre-



1       senta propiedades vesicatorias y lacrimógenas. Por lo tan-  
to, se emplea inmediatamente sin aislarla o purificarla ex-  
tensamente. La bromhidrazona sustituida se suspende en un  
5       disolvente adecuado, por ejemplo metanol absoluto y se aña-  
de malononitrilo. A la mezcla así formada se añade trietilami-  
na disuelta en metanol absoluto mientras se mantiene la tem-  
peratura de la mezcla de reacción a unos 10-20°C mediante  
una refrigeración adecuada. Esta reacción es ligeramente  
10       exotérmica y es necesario enfriar algo para mantener la tem-  
peratura deseada. A medida que transcurre la reacción, la  
suspensión amarilla inicial se disuelve y es sustituida por  
otra suspensión durante un periodo de 1 a 2 horas aproxima-  
damente. El material sólido en esta segunda suspensión es el  
15       producto deseado y se separa por filtración, se lava con me-  
tanol y después con agua y se seca. Por ejemplo, cuando se  
emplea metilhidrazona de bromuro de 1-metil-5-nitroimidazol-  
2-carbonilo, este material sólido es identificado por análi-  
sis elemental y espectro RMN como 5-amino-1-metil-3-(1-me-  
20       til-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo.

20       Los haloalquilimidazolilpirazoles, tales como 5-ami-  
no-1-(haloalquil)-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-  
4-carbonitrilo, se preparan haciendo reaccionar el compuesto  
hidroxialquílico correspondiente con un agente halogenante  
25       como tricloruro de fósforo, tribromuro de fósforo, trifluo-  
ruro de fósforo, cloruro de tionilo y similares. Así, se ha-  
ce reaccionar el 5-amino-1-(β-hidroxietil)-3-(1-metil-5-ni-  
tro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo con cloruro de tio-  
nilo en un disolvente inerte como benceno, en presencia de  
una pequeña cantidad de dimetilformamida, para formar 5-ami-  
30       no-1-(β-cloroetil)-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-



12 MAY. 1975

1 4-carbonitrilo.

Los otros productos intermedios, los formimidatos, se obtienen haciendo reaccionar el 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo, preparado como se ha descrito antes, con orto-ésteres tales como ortoformiato de trimetilo, ortoformiato de trietilo, ortoformiato de tri(n-butilo) o similares, en presencia de una pequeña cantidad de anhídrido acético. Otros orto-ésteres que pueden reaccionar con cualquiera de los 5-aminopirazol-4-carbonitrilos son el ortoformiato de trialilo, ortoformiato de tri(2-cloroetilo), ortoformiato de tri-isobutilo, ortoformiato de tri(2-etilhexilo) y similares. Así, por ejemplo, cuando las sustancias reaccionantes son el 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo, el ortoformiato de trimetilo y una pequeña cantidad de anhídrido acético, el producto obtenido es N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato de metilo.

Las siguientes Preparaciones ilustran la síntesis de los compuestos intermedios.

PREPARACION 1

5-Amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo

A una solución de 5 g (0,0394 moles) de 2-metil-5-nitroimidazol en 100 ml de benceno a reflujo se añade gota a gota una solución de 5 g (0,0394 moles) de sulfato de dimetilo en 10 ml de benceno. La mezcla de reacción se deja a reflujo durante la noche. Después se enfría y a la misma se añade gota a gota una solución de 6 g de carbonato potásico en 6 ml de agua. La mezcla se agita durante una hora y se filtra. Se separan las capas orgánica y acuosa del filtrado y la capa



2 MAY. 1975

1 acuosa se extrae dos veces con 50 ml cada vez de benceno. El  
extracto bencénico se combina con la capa orgánica original  
y se seca sobre sulfato magnésico anhidro. El agente deseca-  
5 dor se separa por filtración. El filtrado se concentra a va-  
cío para dar un producto con un punto de fusión de unos 135-  
138°C. Se identifica como 1,2-dimetil-5-nitroimidazol. Peso:  
4 g.

En un matraz de fondo redondo de 10 litros, equipa-  
do con un agitador mecánico, un condensador de reflujo y un  
10 embudo de decantación, se introducen 705 g (5,0 moles) de 1,2-  
dimetil-5-nitroimidazol y 3,75 litros de etanol absoluto. La  
disolución se consigue agitando. A la solución así preparada  
se añaden rápidamente 685 g (6,5 moles) de benzaldehído. A  
esta mezcla se añaden rápidamente 150 g de sodio disuelto en  
15 2,5 l de metanol, siendo realizada la adición a la tempera-  
tura ambiente. La mezcla de reacción se agita y calienta a  
unos 70°C durante un periodo de 90 minutos aproximadamente.  
A una temperatura de 40°C, cambia el color a pardo oscuro.  
Al cabo de los 90 minutos, la mezcla producto de reacción se  
20 deja enfriar durante 90 minutos sumergiendo la vasija de reac-  
ción en un baño de agua de hielo. Se forma un precipitado. Se  
filtra la mezcla parda. El producto cristalino se lava cua-  
tro veces con una mezcla de hielo, agua y etanol, en una rela-  
ción 1:1:1, empleando 1 l de la mezcla. El producto cristali-  
no se seca al aire a 100°C. Se identifica como 1-metil-5-ni-  
tro-2-estirilimidazol. Tiene un punto de fusión de 191-192°C  
25 aproximadamente. Peso: 582 g.

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 5 l de ca-  
30 pacidad, equipado con un agitador y un tubo de introducción  
de gases, se prepara una solución de 454 g (2,0 moles) de 1-



1 metil-5-nitro-2-estirilimidazol en una mezcla de 2,5 l de me-  
tanol, 1,5 l de diclorometano y 200 ml de agua. El matraz se  
mantiene a la temperatura ambiente mediante un baño de agua.  
Se hace pasar a través de la solución una mezcla de ozono  
5 y oxígeno (3 % de O<sub>3</sub>, a razón de 1,1 l por minuto). La forma-  
ción del ózónido es controlada a intervalos por cromatogra-  
fía de gas-líquido (CGL) y cromatografía en capa fina (CCF).  
El tiempo total de ozonolisis es alrededor de 25 horas, al  
cabo de las cuales el color de la solución se ha vuelto ama-  
10 rillo pálido.

Una solución de 594 g de yoduro sódico en 2 l de  
agua y 400 ml de ácido acético se agita en un matraz de fondo  
redondo de 10 l mientras la solución de ozonolisis se vierte  
en el mismo con bastante rapidez, manteniendo la temperatura  
15 por debajo de 40°C mediante un baño de agua de hielo. Después  
de agitar la mezcla durante unos 10 minutos, se añade una so-  
lución de metabisulfito sódico (192 g en 2 l de agua) para se-  
parar el yodo libre y hacer que la solución resultante se vuel-  
va amarilla. La mezcla se agita durante otra hora aproximada-  
20 mente. Después la mezcla se filtra y se desprecian los cris-  
tales amarillos. El filtrado se concentra a vacío hasta apro-  
ximadamente un tercio de su volumen y se neutraliza a pH 6,5  
por adición de bicarbonato sódico sólido, agitando. Se re-  
quieren alrededor de 300 g de bicarbonato sódico. La mezcla  
25 se extrae cuatro veces con 700 ml cada vez de acetato de eti-  
lo. Los extractos combinados en acetato de etilo se secan so-  
bre sulfato magnésico anhidro durante media hora aproximada-  
mente. Se separa por filtración el agente desecador y el fil-  
trado se concentra a vacío para dar un sólido pegajoso. Este  
30 sólido se recoge en unos 2,5 l de n-hexano y la mezcla se ca-



1 luenta a reflujo durante unos 15 minutos. El sólido pardo re-  
sidual se separa por filtración. Al enfriar, el filtrado depo-  
sita cristales amarillos que se filtran y se secan a vacío a  
40°C. El filtrado se utiliza repetidamente para refluir el  
5 sólido pardo residual procedente de la operación anterior,  
de la misma forma que antes, hasta que se han realizado cua-  
tro extracciones del tipo descrito. Se obtiene un total de  
unos 146 g de producto con un punto de fusión de 81-83°C apro-  
ximadamente, que se identifica como 1-metil-5-nitroimidazol-2-  
10 carboxaldehído.

Se hierve a reflujo durante unas 2 horas una mezcla  
de 23,5 g (0,152 moles) de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxal-  
dehído y 7,0 g (0,152 moles) de metilhidrazina en 300 ml de  
cloroformo. La mezcla producto de reacción se evapora a se-  
15 quedad para formar un sólido amarillo brillante que pesa alre-  
dedor de 25,5 g. Una pequeña muestra cristalizada en etanol  
tiene un punto de fusión de unos 175°C. Se identifica como me-  
tilhidrazona de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído.

A una solución agitada de 23,5 g (0,128 moles) de  
20 metilhidrazona de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído  
en 200 ml de cloroformo se añaden lentamente, a la temperatu-  
ra ambiente, 22,9 g (0,128 moles) de N-bromosuccinimida. La  
reacción es ligeramente exotérmica y la temperatura interna  
se mantiene por debajo de 30°C mediante refrigeración externa  
25 ocasional. Después de agitar durante unas 2 horas, el cloro-  
formo disolvente se separa a vacío y el residuo se extrae  
cinco veces con 100 ml cada vez de tetracloruro de carbono  
caliente. Se desprecia el residuo insoluble y los extractos  
en tetracloruro de carbono combinados se concentran para dar  
30 un sólido amarillo brillante, identificado como metilhidrazo-



02 MAY. 1975

1 na de bromuro de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carbonilo.

La cromatografía en capa fina indica que el compues  
to es casi puro. Rendimiento: 31,0 g.

5 Este compuesto es inestable y presenta propiedades  
vesicantes y lacrimógenas. Se utiliza inmediatamente sin pu-  
rificarlo más en la siguiente etapa de la preparación.

10 Se suspenden 31,0 g (0,118 moles) de la bromohidra-  
zona así preparada en 250 ml de metanol absoluto y se añaden  
7,80 g (0,118 moles) de malononitrilo bidestilado. A la mez-  
cla se añade gota a gota una solución de 12 g (0,118 moles)  
de trietilamina en 25 ml de metanol mientras se mantiene la  
mezcla de reacción a una temperatura de unos 10-20°C. La  
reacción es ligeramente exotérmica.

15 Se disuelve la suspensión amarilla inicial y es  
reemplazada por otra suspensión durante un periodo de 1 a 2  
horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se filtra  
la mezcla producto de reacción y se recoge el material sólido.  
El sólido se lava con metanol y después con agua y se  
seca. Este producto sólido tiene un punto de fusión superior  
20 a 300°C y pesa alrededor de 23 g. Se identifica como 5-amino-  
1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitri-  
lo. El producto es analíticamente puro cuando se aisla.

PREPARACION 2

25 5-Amino-1-(2-hidroxietyl)-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pi-  
razol-4-carbonitrilo

30 Se hierve a reflujo durante unas 2 horas una mezcla  
de 15,5 g (0,1 moles) de 1-metil-5-nitro-2-imidazolcarboxal-  
dehido y 7,6 g (0,1 moles) de 2-hidroxiethylhidrazina en 300  
ml de clorofórmio. La mezcla producto de reacción se evapora  
a sequedad a vacío para dar un producto que pesa 21,3 g y



1 tiene un punto de fusión de unos 122-129°C. Este producto  
se identifica como 2-hidroxietilhidrazona de 1-metil-5-nitro-  
2-imidazolcarboxaldehído. Una pequeña muestra recristalizada  
5 en agua tiene un punto de fusión de 136-140°C aproxima-  
mente.

A una solución agitada de 21,3 g (0,1 moles) de 2-  
hidroxietilhidrazona de 1-metil-5-nitro-2-imidazolcarboxal-  
dehído (preparada antes) en 200 ml de cloroformo se añaden  
poco a poco, manteniendo la temperatura por debajo de 30°C,  
10 17,8 g (0,1 moles) de N-bromosuccinimida. La mezcla de reac-  
ción se agita durante unas 3 horas a 25°C aproximadamente.  
La mezcla producto de reacción se concentra a vacío y el re-  
siduo se extrae ocho veces con 500 ml cada vez de tetraclo-  
ruro de carbono caliente. Los extractos de tetracloruro de  
15 carbono combinados se concentran a vacío para dar un sólido  
amarillo brillante, identificado como 2-hidroxietilhidra-  
zona de bromuro de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carbonilo. El  
producto tiene un punto de fusión de 85-94°C aproximadamente  
y pesa 20,7 g.

20 Se suspenden 20,7 g (0,071 moles) de la bromohidra-  
zona así preparada en 150 ml de metanol anhidro y se añaden  
4,7 g (0,071 moles) de malononitrilo. A la mezcla se añade  
gota a gota una solución de 7,3 g de trietilamina en 15 ml  
de metanol absoluto mientras se mantiene la temperatura de  
25 reacción alrededor de 10-20°C mediante un baño de agua de  
hielo.

Se forma un precipitado denso que se separa por  
filtración al cabo de una hora aproximadamente y se lava con  
una pequeña cantidad de etanol absoluto comercial. El mate-  
30 rial tiene un punto de fusión de 242-243°C aproximadamente y



1 se identifica por análisis elemental y espectro RMN como 5-  
amino-1-(2-hidroxietyl)-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pi-  
razol-4-carbonitrilo.

PREPARACION 3

5 5-Amino-1-(2-cloroetyl)-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pira-  
zol-4-carbonitrilo

Se calienta a reflujo durante unas 24 horas una mez-  
cla de 1 g de 5-amino-1-(2-hidroxietyl)-3-(1-metil-5-nitro-  
2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo (preparado antes), 25 ml  
10 de cloruro de tionilo, 2 gotas de dimetilformamida y 5 ml de  
benceno. La mezcla producto de reacción se concentra a vacío  
para dar una goma roja como residuo. Este residuo se tritura  
con etanol absoluto comercial para dar un sólido amarillo que  
15 pesa alrededor de 0,7 g y tiene un punto de fusión de unos  
226-228°C. Se identifica por análisis elemental y espectro  
RMN como 5-amino-1-(2-cloroetyl)-3-(1-metil-5-nitro-2-imida-  
zolil)pirazol-4-carbonitrilo.

PREPARACION 4

20 5-Amino-1-etil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-car-  
bonitrilo

Se calienta a reflujo durante unas 24 horas una mez-  
cla de 5,0 g (0,0322 moles) de 1-metil-5-nitroimidazol-2-car-  
boxaldehido, 3,4 g (0,0322 moles) de oxalato de etilhidrazi-  
na y 3,3 g (0,322 moles) de trietilamina en 100 ml de cloro-  
25 formo. Se enfría la mezcla producto de reacción, se suspende  
con unos 25 ml de agua y se filtra la mezcla para dar un só-  
lido amarillo. Por cromatografía en capa fina de una muestra  
del sólido amarillo, empleando acetato de etilo/benceno en  
una relación 1:1, se observa una mancha amarilla principal  
30 más trazas de dos impurezas que se mueven más rápidamente. El



12 MAY. 1975

1 producto, etilhidrazona de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído, se utiliza sin purificarlo más.

5 A una mezcla agitada de 6,8 g (0,0322 moles) de etilhidrazona de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carboxaldehído y 100 ml de cloroformo se añaden poco a poco 5,8 g (0,0322 moles) de N-bromosuccinimida mientras se mantiene la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 30°C. Después de agitar a la temperatura ambiente durante 3 horas aproximadamente, la mezcla producto de reacción se concentra a vacío. El  
10 residuo que se obtiene se extrae tres veces con 250 ml cada vez de tetracloruro de carbono caliente. Los extractos de tetracloruro de carbono combinados se concentran a vacío para dar un sólido amarillo que pesa 6,3 g. Este compuesto, etilhidrazona de bromuro de 1-metil-5-nitroimidazol-2-carbonilo, se emplea sin purificarlo más en la siguiente etapa de la  
15 preparación.

20 Se suspenden 6,3 g (0,0228 moles) de la bromohidrazina así preparada en 75 ml de etanol absoluto y se añaden poco a poco 1,5 g (0,0228 moles) de malononitrilo. La temperatura se mantiene a unos 10-20°C empleando un baño de agua de hielo. Una vez completada la adición, la mezcla producto de reacción se agita durante una hora aproximadamente, a la temperatura ambiente. Se filtra la mezcla producto de reacción. El material sólido que se recupera se recrystaliza en  
25 dimetilformamida para dar un sólido amarillo que pesa 2,3 g, tiene un punto de fusión de unos 284-285°C y se identifica por análisis elemental y espectro RMN como 5-amino-1-etil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)-pirazol-4-carbonitrilo.

30



MAY. 1975

1

PREPARACION 5

N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo

5

Se calienta a reflujo durante unas 24 horas una mezcla de 1 g de 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo, 12 ml de ortoformiato de trimetilo y 1 ml de anhídrido acético y después se deja enfriar. Se filtra la mezcla producto de reacción. El material sólido que se separa por filtración se recristaliza en etanol absoluto comercial para dar un producto con un punto de fusión de unos 184-185°C. El producto se identifica por análisis elemental y espectro RMN como N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo.

10

15

Siguiendo el mismo procedimiento general indicado en la Preparación 5 y empleando materiales de partida apropiados, se preparan los siguientes formimidatos homólogos intermedios adicionales:

20

N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de butilo, con un punto de fusión de 120-121°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental y espectro RMN.

25

N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de alilo, con un punto de fusión de 131-133°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental y espectro RMN.

30

N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de 2-cloroetilo, con un punto de fusión de 169-171°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental.



MAY. 1975

1 N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil) pirazol-5-il] formimidato de isobutilo, con un punto de fusión de 134-136°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental.

5 N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil) pirazol-5-il] formimidato de 2-etilhexilo, con un punto de fusión de 93-94°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental.

10 Los siguientes ejemplos ilustran la síntesis de los compuestos.

EJEMPLO 1

1-Metil-3-(1-metil-5-nitromidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona

15 Se calienta a reflujo durante unas 2 horas una mezcla de 1,0 g de 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil) pirazol-4-carbonitrilo y 25 ml de ácido fórmico al 90 %. Se enfría la mezcla producto de reacción y el disolvente se separa a vacío. El residuo, que pesa 1,2 g, se recristaliza en dimetilformamida para dar un producto con un punto de fusión de  
20 291-292°C aproximadamente, que se identifica por análisis elemental y espectro RMN como 1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona.

EJEMPLO 2

25 6-Etil-1,5-dihidro-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona

30 Se calienta a reflujo durante unas 24 horas una mezcla de 1,0 g de 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo y 25 ml de anhídrido propiónico y después se enfría. La solución oscura deposita cristales lentamente. Los cristales se recristalizan en etanol absoluto comer-



1 mercial para dar un producto con un punto de fusión de unos  
243-245°C que se identifica por análisis elemental como 6-  
etil-1,5-dihidro-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-  
4H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona.

5 EJEMPLO 3

6-(Clorometil)-6,7-dihidro-6-hidroxi-1-metil-3-(1-metil-5-ni-  
troimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4(5H)-ona, és-  
ter cloroacético

10 Se calienta a reflujo durante unas 24 horas una mez-  
cla de 1,0 g de 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imida-  
zolil)pirazol-4-carbonitrilo, 3,5 g de anhídrido cloroacéti-  
co, 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y 20 ml de bence-  
no. Se enfría la mezcla producto de reacción y se filtra pa-  
15 ra dar un sólido crudo. Este sólido se recristaliza en etanol  
absoluto comercial formando cristales blancos con un punto  
de fusión de 217-218°C aproximadamente, con descomposición,  
que se identifica por análisis elemental y espectro RMN como  
el éster cloroacético de la 6-(clorometil)-6,7-dihidro-6-hi-  
droxi-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo  
20 [3,4-d] pirimidin-4(5H)-ona.

EJEMPLO 4

4-Amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazo-  
lo [3,4-d] pirimidina

25 Se calienta a reflujo durante una hora aproxima-  
damente una mezcla de 2 g de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-  
nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato de metilo, 20 ml  
de etanol absoluto y 10 ml de hidróxido amónico concentrado.  
Se enfría la mezcla producto de reacción y se filtra para  
30 dar un sólido amarillo. El sólido se recristaliza en dimetil  
formamida para dar un producto con un punto de fusión de 317-



1 318°C aproximadamente, con descomposición, que se identifica por espectros infrarrojo y RMN, así como por análisis elemental, como 4-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina.

5 4a. La sal hidrocioruro de este compuesto se prepara como sigue:

Se prepara una mezcla de 1,0 g de 4-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina y 70 ml de éter seco y se hace borbotear a través de la mezcla cloruro de hidrógeno durante 15 minutos aproximadamente, mientras se enfría la mezcla en un baño de hielo y agua a unos 0°C; durante este tiempo, la suspensión amarilla cambia el color a rosa. La mezcla producto de reacción se tapa y se deja en reposo durante una hora aproximadamente, a 0°C. Se filtra la mezcla para dar cristales de color rosa pálido con un punto de fusión de 268-269°C aproximadamente (desc.) y un peso de alrededor de 1,2 g. El producto se identifica por análisis elemental y espectro RMN como hidrocioruro de 4-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina.

20 4b. La sal sulfato de este compuesto se prepara como sigue:

25 A 1,0 g de 4-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina suspendidos en 25 ml de metanol se añaden gota a gota 0,72 g de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agita a la temperatura ambiente durante unas 2 a 3 horas. Se filtra la mezcla producto de reacción. El sólido obtenido tiene un punto de fusión de 222-229°C aproximadamente y se identifica por análisis elemental y espectros RMN e IR como sulfato de 4-amino-1-metil-3-(1-me-

30



MAY 1975

1 til-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina.

EJEMPLO 5

4,5-Dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-  
5-propil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina

5 Se agita a la temperatura ambiente durante unos 10 minutos una mezcla de 1,0 g de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo, 5 ml de n-propilamina y 10 ml de etanol. Se filtra la mezcla producto de reacción y el sólido que se recupera se recristaliza en dimetilformamida para dar un producto con un punto de fusión de unos 239-240°C. El producto se identifica por espectro RMN y análisis elemental como 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-10 3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-propil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina.

15 5a. La sal hidrocioruro del compuesto anterior se prepara como sigue:

Se prepara una suspensión de 0,45 g de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-propil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina en 65 ml de éter etílico anhidro y se hace borbotear cloruro de hidrógeno seco a través de la 20 mezcla agitada a 0°C, durante unos 15 minutos. Después se tapa el matraz y se mantiene a 0°C durante una hora aproximadamente. Después se filtra la mezcla para dar 0,4 g de un sólido con un punto de fusión de unos 230-231°C. El sólido se 25 identifica por análisis elemental como hidrocioruro de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-propil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina.

30 Se preparan otras sales de adición de ácido del compuesto del Ejemplo 5 siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 4b y utilizando los ácidos apropiados:



1 5b. Mononitrato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-propil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina, con un punto de fusión de 209-212°C aproximadamente. Identificado por espectro RMN y análisis elemental.

5 5c. Monosulfato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-propil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina, con un punto de fusión de 255-257°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental.

EJEMPLO 6

10 N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-il] glicina

15 Se calienta a reflujo durante hora y media aproximadamente una mezcla de 1,0 g de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato de metilo, 0,3 g de glicina, 0,4 g de carbonato sódico, 20 ml de etanol y 20 ml de agua. Se enfría la mezcla producto de reacción y se filtra para dar un producto crudo. Este producto se disuelve en agua caliente, se enfría y la solución se acidula con ácido sulfúrico concentrado para dar un precipitado gris azulado. Este precipitado se separa por filtración y se recristaliza en dimetilformamida para dar un producto con un punto de fusión de 240-241°C aproximadamente. El producto se identifica por análisis elemental y espectro RMN como N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-il] glicina.

25 Siguiendo el mismo procedimiento general indicado en el Ejemplo 6 y empleando materiales de partida apropiados, se prepara el siguiente compuesto adicional:

30 N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-il] metionina, con un punto de fu-



12 MAY 1975

1 sión de 207-208°C aproximadamente (desc.). Identificado por  
espectro RMN y análisis elemental.

EJEMPLO 7

5 5-Etil-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-  
2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina

Se calienta a reflujo durante 24 horas aproximada-  
mente una mezcla de 1,0 g de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-  
nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo, 10 ml  
de una solución acuosa de etilamina al 70 % y 20 ml de etanol.  
10 Se enfría la mezcla producto de reacción y se filtra para dar  
un sólido verde pálido. El sólido se recristaliza en piridina  
para dar un producto con un punto de fusión de 279-281°C apro-  
ximadamente. El producto se identifica por espectro infrarro-  
jo como 5-etil-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-  
15 imidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina.

EJEMPLO 8

20 5-[2-(Dimetilamino)etil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-me-  
til-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina

Se agita a la temperatura ambiente durante una hora  
aproximadamente una mezcla de 1,0 g de N-[4-ciano-1-metil-3-  
(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de me-  
tilo, 0,6 g de dimetiletildiamina asimétrica y 30 ml de eta-  
nol. Se filtra la mezcla producto de reacción y el sólido que  
se recupera se cristaliza en dimetilformamida para dar un  
25 producto con un punto de fusión de unos 192-194°C. El produc-  
to se identifica por análisis elemental y espectro RMN como  
5-[2-(dimetilamino)etil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina.

30 Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 8 em-  
pleando materiales de partida apropiados, se preparan nuevos



12 MAY 1975

1 compuestos adicionales, enumerados a continuación.

8a. 5-[2-(Diethylamino)etil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 146-148°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental y espectro RMN.

5 8b. 4,5-Dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-5-etanol, con un punto de fusión de 272-274°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental.

10 8c. 4,5-Dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(9-octadecenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 110-114°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental.

15 8d. 4,5-Dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(4-piridilmetil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 256-258°C aproximadamente. Identificado por análisis elemental y espectro RMN.

20 8e. 4,5-Dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(2-piridilmetil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 248-249°C aproximadamente (desc.). Identificado por análisis elemental y espectros RMN e IR.

25 8f. 4,5-Dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(3-piridilmetil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 231-233°C aproximadamente. Identificado por espectros RMN e IR y análisis elemental.

Empleando la base (8) preparada antes, se prepara la siguiente sal de adición de ácido, identificada como 8g:

30 8g. Se prepara una suspensión de 0,6 g de 5-[2-(dimetilamino)etil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-ni-



1 troimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina en 50 ml de  
éter anhidro, se enfría a 0°C en un baño de hielo y agua y  
se hace borbotear cloruro de hidrógeno a través de la suspen-  
5 sión agitada durante unos 15 minutos. Transcurrido este tiem-  
po, se tapa el matraz y la mezcla de reacción se deja en re-  
poso a 0°C durante una hora aproximadamente. Después se fil-  
tra la mezcla y el sólido que se recoge sobre el filtro se la-  
va con éter anhidro para dar un polvo blanquecino con un pun-  
to de fusión de 251-252°C aproximadamente (desc.). El produc-  
10 to se identifica por análisis elemental y espectro RMN como  
dihidrocloruro de 5-[2-(dimetilamino)etil]-4,5-dihidro-4-imino-1-  
metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]  
pirimidina.

15 Empleado la base (8a) antes preparada, se preparan  
las siguientes sales de adición de ácido, identificadas como  
8h y 8i:

20 8h. Difosfato de 5-[2-(dietilamino)etil]-4,5-dihidro-4-  
imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pi-  
razolo [3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 154-166°C  
aproximadamente. Identificado por análisis elemental y espec-  
tro RMN.

25 8i. Disulfato de 5-[2-(dietilamino)etil]-4,5-dihidro-4-  
imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 229-234°C apro-  
ximadamente. Identificado por análisis elemental y espectro  
RMN.

30 Empleado la base (8d) antes preparada, se preparan  
las siguientes sales de adición de ácido, identificadas como  
8j, 8k y 8l:

8j. Se enfría a 0°C, con agitación, una mezcla de



1 0,94 g de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimi-  
dazol-2-il)-5-(4-piridilmetil)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina  
y 65 ml de éter anhidro y se hace borbotear cloruro de hidró-  
5 géno seco a través de la mezcla durante unos 15 minutos. Des-  
pués se tapa el matraz y se mantiene a 0°C durante una hora  
aproximadamente. Se filtra la mezcla para dar 1,1 g de un sól-  
lido amarillo con un punto de fusión de 233-234°C aproxima-  
damente (desc.). El sólido amarillo se identifica por análi-  
sis elemental como dihidrocloruro de 4,5-dihidro-4-imino-1-  
10 metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(4-piridilmetil)-  
1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina.

8k. A una suspensión de 0,7 g de 4,5-dihidro-4-imi-  
no-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(4-piridilme-  
til)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina en 25 ml de metanol se  
15 añaden 0,9 g de ácido fosfórico al 85 %. La mezcla se agi-  
ta durante unas 3 horas a la temperatura ambiente. Se filtra  
la mezcla producto de reacción y el sólido sobre el filtro  
se lava con una pequeña cantidad de metanol. Se recristaliza  
el sólido en metanol para dar un producto que pesa alrede-  
20 dor de 0,4 g y tiene un punto de fusión de 198-202°C apro-  
ximadamente. El producto se identifica por análisis elemen-  
tal como difosfato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-me-  
til-5-nitroimidazol-2-il)-5-(4-piridilmetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d] pirimidina.

25 8l. Dinitrato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(4-piridilmetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d] pirimidina, con un punto de fusión de 174-176°C apro-  
ximadamente. Identificado por espectro RMN y análisis ele-  
30 mental.

Empleando la base (8e) preparada anteriormente, se



1 preparan las siguientes sales de adición de ácido, identi-  
ficadas como 8m y 8n:

5 8m. Dinitrato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(2-piridilmetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 178-180°C apro-  
ximadamente. Identificado por espectro RMN y análisis elemen-  
tal.

10 8n. Disulfato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(2-piridilmetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 258-260°C apro-  
ximadamente. Identificado por análisis elemental y espectro  
RMN.

15 Empleando la base (8f) antes preparada, se preparan  
las siguientes sales de adición de ácido, identificadas como  
8o, 8p y 8q:

20 8o. Disulfato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(3-piridilmetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 267-272°C apro-  
ximadamente. Identificado por análisis elemental.

8p. Trifosfato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(3-piridilmetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 183-184°C apro-  
ximadamente. Identificado por análisis elemental.

25 8q. Dinitrato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(3-piridilmetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 228-232°C apro-  
ximadamente. Identificado por espectro RMN y análisis ele-  
mental.



EJEMPLO 9

4-Hidrazino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina

Se agita durante una hora aproximadamente, a la temperatura ambiente, una mezcla de 1 g de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo, 1 ml de hidrazina y 10 ml de etanol. Se filtra la mezcla producto de reacción y el sólido que se recoge se recristaliza en dimetilformamida para dar un sólido amarillo con un punto de fusión de 246-248°C aproximadamente. El producto se identifica por análisis elemental y espectro RMN como 4-hidrazino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina.

Las sales de adición de ácido de este compuesto se preparan como sigue:

9a. A una suspensión de 0,5 g de 4-hidrazino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina en 25 ml de metanol se añaden gota a gota 0,4 g de ácido fosfórico al 85 % y la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante unas 2 horas. Se filtra la mezcla producto de reacción y el sólido obtenido se lava sobre el filtro con un poco de metanol. El sólido pesa 0,5 g y tiene un punto de fusión de 222-225°C aproximadamente. El sólido se identifica por análisis elemental y espectro RMN como monofosfato de 4-hidrazino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina.

9b. Monosulfato de 4-hidrazino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 248-250°C aproximadamente. Identificado por espectro RMN y análisis elemental.



MAY. 1975

1

EJEMPLO 10

5-[3-(Dimetilamino)propil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

5

Se calienta a reflujo durante unas 2 horas una mezcla de 1,5 g de N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato de butilo, 0,93 g de 3-aminopropildimetilamina (dimetilaminopropilendiamina asimétrica) y 50 ml de etanol absoluto comercial. La mezcla producto de reacción se enfría y filtra. El sólido que se recupera se recristaliza en dimetilformamida para dar un producto con un punto de fusión de 151-154°C aproximadamente. El producto se identifica por análisis elemental como 5-[3-(dimetilamino)propil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.

10

15

10a. Una mezcla de 0,72 g de la base libre preparada antes y 65 ml de éter anhidro se mantiene a 0°C mientras se pasa a través de la mezcla cloruro de hidrógeno seco, durante 15 minutos aproximadamente. Se tapa el matraz con su contenido y se deja en reposo durante una hora a 0°C. Se filtra la mezcla para dar 1 g de un sólido higroscópico con un punto de fusión de 266-268°C aproximadamente (desc.). El producto se identifica por análisis elemental como monohidrato de dihidrocloruro de 5-[3-(dimetilamino)propil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.

20

25

EJEMPLO 11

N-[1-Metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il]acetamida

30

Se calienta a reflujo durante unas 22 horas una mezcla de 2,3 g de 4-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimida-



1 zol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina y 30 ml de anhídrido  
acético. La mezcla producto de reacción se enfría y filtra.  
El sólido que se obtiene se recristaliza en dimetilformamida  
para dar un producto con un punto de fusión de unos 284-286°C.  
5 El producto se identifica por análisis elemental y espectro  
RMN como N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pira-  
zolo[3,4-d]pirimidin-4-il]acetamida.

EJEMPLO 12

10 1,5-Dihidro-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-6-(tri-  
fluormetil)-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona

Se calienta a reflujo durante la noche una mezcla de  
3 g de 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pira-  
zol-4-carbonitrilo y 25 ml de anhídrido trifluoracético para  
dar un material sólido. Este sólido se recristaliza en etanol  
15 para dar dos productos. El producto de punto de fusión más  
alto funde aproximadamente a 284-286°C. Se identifica por  
análisis elemental como 1,5-dihidro-1-metil-3-(1-metil-5-ni-  
troimidazol-2-il)-6-(trifluormetil)-4H-pirazolo[3,4-d]pirimi-  
din-4-ona. El otro producto, el de punto de fusión más bajo,  
20 que funde aproximadamente a 225-228°C, se identifica por  
análisis elemental como N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-ni-  
troimidazol-2-il)pirazol-5-il]-2,2,2-trifluoracetamida.

EJEMPLO 13

25 1,5-Dihidro-1,6-dimetil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-4H-  
pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona

Se calienta a reflujo durante una hora aproximadamen-  
te una mezcla de 5 g de 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-  
2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo, 10 ml de ácido sulfúrico  
concentrado y 20 ml de etanol absoluto. Después se enfría la  
30 mezcla producto de reacción y se añaden 50 ml de agua a la



1 misma. El producto crudo que precipita se identifica por  
CCF como 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pi-  
razol-4-carboxamida con un punto de fusión de 249-250°C apro-  
ximadamente. Este material se emplea sin purificarlo más.

5 Se calienta a reflujo durante unas 6 horas una mez-  
cla de 1 g de la carboxamida preparada antes y 10 ml de anhí-  
drido acético. La mezcla producto de reacción se concentra  
a vacío. El residuo se recristaliza en etanol para dar un  
10 producto con un punto de fusión de unos 287-288°C con descom-  
posición. Se identifica por análisis elemental como 1,5-di-  
hidro-1,6-dimetil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-4H-pirazo-  
lo[3,4-d]pirimidin-4-ona.

EJEMPLO 14

15 Dietilacetal de 4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-  
2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-5(4H)-acetaldehido

Se agita aproximadamente a la temperatura ambiente,  
durante unas 2 horas, una mezcla de 2 g de N-[4-ciano-1-me-  
til-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimida-  
20 to de metilo, 1,7 g de dietilacetal de aminoacetaldehido y  
30 ml de etanol absoluto comercial. Una vez transcurrido ese  
tiempo, se filtra la mezcla producto de reacción. El sólido  
que se recoge se recristaliza en dimetilformamida para dar  
un producto cristalino con un punto de fusión de 160-164°C  
aproximadamente. El producto se identifica por análisis ele-  
25 mental y espectro RMN como dietilacetal de 4-imino-1-metil-  
3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d] piri-  
midin-5(4H)-acetaldehido.

EJEMPLO 15

30 Dihidrocloruro de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-  
nitroimidazol-2-il)-5-(2-morfolinoetil)-1H-pirazolo[3,4-d]  
pirimidina



MAY 1978

1                   Se agita alrededor de la temperatura ambiente, du-  
rante hora y media aproximadamente, una mezcla de 2 g de N-  
[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-  
il]formimidato de metilo, 1,6 g de N-(2-aminoetil)morfolina  
5 y 50 ml de etanol absoluto comercial. Transcurrido ese tiempo,  
se filtra la mezcla producto de reacción. El sólido que se  
recoge se recristaliza en dimetilformamida para dar un mate-  
rial con un punto de fusión de 232-234°C aproximadamente, que  
se identifica por espectro RMN como 4,5-dihidro-4-imino-1-me-  
10 til-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(2-morfolinoetil)-1H-  
pirazolo[3,4-d]pirimidina.

15                   15. La sal dihidrocloruro del compuesto anterior  
se prepara como sigue:

Una suspensión de 0,8 g del compuesto en 65 ml de  
15 éter etílico anhidro se enfría a unos 0°C y se mantiene a  
esa temperatura mientras se hace borbotear cloruro de hidróge-  
no anhidro a través de la mezcla durante unos 15 minutos. Des-  
pués se tapa el matraz y se deja en reposo alrededor de 0°C  
durante una hora aproximadamente. Después se filtra la mezcla  
20 para dar 0,9 g de un sólido con un punto de fusión de unos  
256-257°C (desc.). El sólido se identifica por análisis ele-  
mental como dihidrocloruro de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-  
(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(2-morfolinoetil)-1H-pirazo-  
lo [3,4-d]pirimidina.

25                   Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 8i,  
se preparan otras sales de adición de ácido de la base ante-  
rior (15) como sigue:

30                   15b. Difosfato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(2-morfolinoetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 203-208°C apro-



1 ximadamente. Identificado por espectro RMN y análisis elemen-  
tal.

5 15c. Dinitrato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(2-morfolinoetil)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, con un punto de fusión de 183-185°C apro-  
ximadamente. Identificado por análisis elemental.

10 Los miembros de esta serie de compuestos han presen-  
tado actividad in vitro contra varios organismos, muchos de  
los cuales son importantes patógenos de los animales. La acti-  
vidad antimicrobiana in vitro de los nitroimidazoles ha si-  
do determinada empleando el ensayo de dilución en tubo.

#### EXPERIMENTO 1

La eficacia de los nuevos compuestos contra la bac-  
teria Escherichia coli fué determinada como sigue:

15 Esta bacteria, Escherichia coli, crece rápidamente  
a títulos de alrededor de  $10^{9,0}$  mcg/ml (ml de medio) y produ-  
ce un crecimiento muy visible al cabo de un corto periodo de  
incubación. Para realizar este ensayo, se solubiliza una  
20 muestra de 5,0 mg de la pirazolopirimidina en 5,0 ml de di-  
metilsulfóxido (DMSO). Después se añade esta solución a  
45,0 ml de un caldo estéril de Mueller-Hinton para dar una  
concentración de 100 mcg/ml del compuesto. Se prepara una  
serie de diluciones al doble de esta mezcla en cantidades  
de 5,0 ml, empleando caldo de Mueller-Hinton como diluyente,  
25 oscilando las diluciones finales entre 100,0 y 0,78 mcg/ml.  
Se incluye un tubo de control que contiene 5,0 ml de caldo  
de Mueller-Hinton. Empleando una pipeta de 1,0 ml, cada tu-  
bo de ensayo se inocula con una gota de una dilución  $10^{-4,0}$   
de la bacteria E. coli preparada en caldo Mueller-Hinton. Des-  
30 pués los tubos de ensayo se incuban a unos 36°C durante 20-22



1975

1  
  
  
5  
  
  
10  
  
  
15  
  
  
20  
  
  
25  
  
  
30

horas y se determina la concentración mínima de inhibición (CMI) del compuesto de ensayo para esa bacteria, tomada como la concentración que evita completamente un crecimiento visible.

El ejemplo anterior sirve para ilustrar el procedimiento de ensayo general empleado. Como saben bien los expertos en este campo, es necesario introducir variaciones en ciertas partes del procedimiento de acuerdo con el organismo experimental específico. Así, cuando se utilizan ciertas bacterias como la *pasteurella*, donde el crecimiento es relativamente ligero, se emplea un inoculum menos diluído. Con algunas otras bacterias, el tiempo de incubación requerido para el crecimiento es considerablemente superior a 24 horas, a saber, de 36 a 96 horas. De nuevo, estas variaciones necesarias en el tiempo de incubación requerido para el crecimiento son conocidas por los expertos que están familiarizados con los procedimientos de ensayo biológicos. Otra variación en el ensayo antes descrito implica el uso con ciertos micoplasmas de un indicador del cambio de pH, por ejemplo rojo de fenol en el medio específico del micoplasma. La inhibición o prevención del crecimiento se detecta por no producirse un cambio de color.

Los resultados de los ensayos de compuestos representativos, identificados más adelante, se encuentran en la tabla que sigue. En la tabla, la Columna 1 identifica el compuesto de ensayo y las Columnas 2 a 15 dan las CMI en mcg/ml de los compuestos individuales contra los organismos experimentales individuales.

Los compuestos ensayados son identificados por referencia a los números de los ejemplos que describen la prepa-



1 ración de los compuestos.

EXPERIMENTO 2

5 Se estudió la eficacia de los compuestos contra las infecciones causadas en ratones por Pasteurella multocida, cuando se administran por inyección.

Se emplearon unos ratones suizos hembras con un peso de 15 a 20 g aproximadamente. Se pesaron 5,0 mg del compuesto de ensayo y se disolvieron en 0,5 ml de dimetilsulfóxido, agregando esta solución sobre 9,5 ml de una suspensión de carboximetilcelulosa sódica. Se inyectaron intraperitonealmente unos grupos de 5 ratones con 0,1 ml cada uno de la composición de ensayo así preparada. Esta preparación producía una proporción de ensayo de 2,5 mg por kg de peso corporal de ratón. Los compuestos se ensayaron a razón de 1,25, 2,5 o 5,0 mg por kg de peso corporal del ratón y se obtuvieron de forma similar preparaciones de ensayo para las proporciones de 1,25 y 5,0 mg/kg. Inmediatamente después de recibir el compuesto de ensayo, los ratones fueron atacados empleando diluciones logarítmicas en base 10 de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de un cultivo de caldo de triptosa de 16 a 20 horas de Pasteurella multocida a 0,1 ml por ratón, por vía subcutánea. También se atacaron unos grupos similares de ratones de control no tratados, siendo administrado el ataque subcutáneamente. Los grupos de ratones fueron observados diariamente para determinar la mortalidad y después se comparó la mortalidad total en los grupos tratados con la que se producía en los grupos de control no medicados. Los resultados se encuentran en la Tabla II dada a continuación. Cada compuesto de ensayo se identifica por el número del ejemplo que describe su preparación.

30



1

T

				Pasteure- lla mul- tocida				
		Esche- richia	Salmo	Gana- do va		Borde	Strep	Stap
	Comp.	coli	nella	cuno	Pavos	tella	toco- ccus	loco ccus
		<u>monas</u>						
	1	>50,0	25,0	25,0	≤1,56	50,0	>50,0	>50,0
	2	>50,0	>50,0	>50,0	3,12	50,0	>50,0	50,0
	3	>50,0	>50,0	>50,0	3,12	50,0	>50,0	50,0
	4	>50,0	>50,0	>50,0	0,19	1,56	>50,0	>50,0
10	4a	>50,0	>50,0	>50,0	<0,78	<0,78	>50,0	>50,0
	4b	50,0	12,5		6,25	6,25	50,0	50,0
	5	50,0	50,0	50,0	0,19	3,12	>50,0	6,25
	5a	25,0	12,5	12,5	<0,78	<0,78	50,0	6,25
	5b	12,5	12,5	25,0	1,56	1,56	25,0	12,5
15	5c	12,5	12,5	50,0	3,12	1,56	25,0	12,5
	6	>50,0	>50,0	50,0	<0,78	6,25	50,0	12,5
	7	50,0	12,5	25,0	<0,78	1,56	50,0	6,25
	8	50,0	25,0	12,5	<0,78	3,12	50,0	<0,78
	8a	>50,0	>50,0	>50,0	<0,78	>50,0	>50,0	>50,0
20	8b	12,5	25,0	12,5	<0,78	1,56	>50,0	3,12
	8c	12,5	25,0	25,0	<0,78	1,56	>50,0	3,12
	8e	>50,0	>50,0	>50,0	<0,78	6,25	50,0	25,0
	8f	6,25	12,5	25,0	<0,78	<0,78	50,0	3,12
	8g	50,0	12,5	12,5	<0,78	1,56	50,0	<0,78
25	8h	12,5	50,0	50,0	1,56	6,25	50,0	6,25
	8i	50,0	6,25	50,0	6,25	3,12	50,0	12,5
	8k	3,12	12,5	12,5	0,78	3,12	50,0	3,12
	8l	50,0	50,0	25,0	6,25	6,25	50,0	50,0
30	8m	12,5	25,0	25,0	3,12	3,12	25,0	6,25



TABLA I

<u>Pasteurella multocida</u>	<u>Jana- do va cuno</u>	<u>Borde tella</u>	<u>Strep toco- ccus</u>	<u>Staphy loco- ccus</u>	<u>Myco- plas- ma hycr hinis</u>	<u>Myco- plas- ma sy- noviae</u>	<u>Myco- plas- ma hycsy noviae</u>	<u>Myco- plas- ma galli septicum</u>	<u>Vibrio coli</u>	<u>Mycoplas ma hyc- pneumoniae</u>	<u>Hemophi- lus galli narum</u>
≤1,56	50,0	>50,0	>50,0	>50,0	50,0	25,0	>50,0	50,0	6,25	6,25	
3,12	50,0	>50,0	50,0	>50,0	>50,0	50,0	>50,0	50,0	≤1,56	12,5	
3,12	50,0	>50,0	50,0	>50,0	50,0	50,0	>50,0	50,0	50,0	12,5	
0,19	1,56	>50,0	>50,0	>50,0	50,0	1,56		3,12	>50,0	0,39	
<0,78	<0,78	>50,0	>50,0	>50,0	50,0	1,56		>50,0	50,0	>50,0	
6,25	6,25	50,0	50,0	25,0	3,12	50,0		25,0		25,0	
0,19	3,12	>50,0	6,25	12,5	6,25	0,78		1,56	0,19	0,78	
<0,78	<0,78	50,0	6,25	12,5	<1,56	1,56		3,12	1,56	1,56	12,5
1,56	1,56	25,0	12,5	12,5	6,25	3,12		12,5		1,56	
3,12	1,56	25,0	12,5	12,5	6,25	3,12		12,5		3,12	
<0,78	6,25	50,0	12,5	25,0	3,12	6,25		<1,56	<0,78	1,56	
<0,78	1,56	50,0	6,25	12,5	12,5	<0,78		12,5	3,12	1,56	
<0,78	3,12	50,0	<0,78	6,25	3,12	<0,78		<0,78	<0,78	<0,39	
<0,78	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0		12,5	>50,0	>50,0	>50,0
<0,78	1,56	>50,0	3,12	3,12	3,12	6,25		3,12	<0,78	1,56	6,25
<0,78	1,56	>50,0	3,12	1,56	6,25	6,25		3,12	<1,56	1,56	25,0
<0,78	6,25	50,0	25,0	25,0	6,25	12,5		1,56	<0,78		50,0
<0,78	<0,78	50,0	3,12	3,12	<0,78	1,56		<0,78	<0,78		6,25
<0,78	1,56	50,0	<0,78	6,25	6,25	<0,78		3,12	<0,78	<0,78	
1,56	6,25	50,0	6,25	12,5	0,78	1,56		1,56		0,78	
6,25	3,12	50,0	12,5	12,5	3,12	3,12		12,5		6,25	
0,78	3,12	50,0	3,12	3,12	0,78	3,12		0,78		0,78	
6,25	6,25	50,0	50,0	50,0	3,12	6,25		12,5		6,25	
3,12	3,12	25,0	6,25	6,25	1,56	3,12		6,25		6,25	

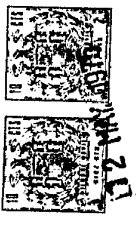


TABLA I (continuación)

	Esche- Pseudo- monas	richia colli	Salmo nella	Pasteurella multocida	Yana- cuno	do va cuno	Pavos	Borde- tella	Strep- toco- ccus	Staphy- loco- ccus	Myco- plas- ma hinae	Myco- plas- ma sp. roviae	Myco- plas- ma galli	Vibrio coli	Mycoplas- ma hyo- pneumoniae	Hemophi- lus galli- marum
8n	50,0	50,0	>50,0	<0,78	3,12	>50,0	6,25	6,25	6,25	<0,78	3,12	<0,78	<0,78	0,78		
8o	25,0	50,0	25,0	3,12	1,56	50,0	3,12	6,25	6,25	1,56	3,12	3,12	3,12	3,12		
8p	50,0	25,0	50,0	3,12	3,12	50,0	12,5	12,5	12,5	1,56	3,12	3,12	3,12	3,12		
8q	12,5	50,0	25,0	6,25	6,25	50,0	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25		
9	>50,0	6,25	6,25	<0,78	<0,78	25,0	1,56	6,25	6,25	1,56	6,25	<0,78	<0,78	<0,78		
9a	50,0	50,0	50,0	3,12	1,56	50,0	3,12	6,25	6,25	1,56	12,5	1,56	1,56	1,56		
9b	50,0	50,0	25,0	1,56	1,56	50,0	3,12	6,25	6,25	1,56	12,5	1,56	1,56	1,56		
10	25,0	6,25	6,25	<0,78		50,0	<0,78	6,25	6,25	<0,78	<0,78	1,56	<0,78	<0,78	6,25	
10a	6,25	6,25	6,25	<0,78	<0,78	25,0	3,12	3,12	3,12	3,12	<0,78	1,56	<0,78	<0,78	6,25	
11	>50,0	>50,0	>50,0	<0,78	3,12	>50,0	25,0	25,0	3,12	3,12	<0,78	1,56	<0,78	<0,78	6,25	
12	>50,0	>50,0	>50,0	50,0	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	50,0	
13	>50,0	>50,0	25,0	<0,78	6,25	12,5	25,0	25,0	>50,0	>50,0	>50,0	25,0	<0,78	>50,0	50,0	
14	>50,0	>50,0	>50,0	3,12	12,5	>50,0	25,0	25,0	50,0	50,0	12,5	25,0	12,5	<0,78	50,0	
15a	50,0	12,5	25,0	<0,78	1,56	>50,0	3,12	6,25	6,25	3,12	3,12	<0,78	>1,56	<0,78	12,5	
15b	25,0	6,25	25,0	1,56	1,56	50,0	6,25	12,5	12,5	3,12	3,12	6,25	1,56	1,56		
15c	50,0	50,0	50,0	25,0	25,0	50,0	50,0	12,5	12,5	1,56	3,12	12,5	12,5	3,12		

1

5

10

15

20

25

30





TABLA I (continuación)

<u>Pasteurella</u> <u>multocida</u>	<u>Pavos</u>	<u>Borde-</u> <u>tella</u>	<u>Strep-</u> <u>toco-</u> <u>ccus</u>	<u>Staphy-</u> <u>loco-</u> <u>ccus</u>	<u>Myco-</u> <u>plas-</u> <u>ma</u> <u>hynis</u>	<u>Myco-</u> <u>plas-</u> <u>ma</u> <u>syno-</u> <u>viae</u>	<u>Myco-</u> <u>plas-</u> <u>ma</u> <u>hyoxy-</u> <u>noviae</u>	<u>Myco-</u> <u>plas-</u> <u>ma</u> <u>galli-</u> <u>septicum</u>	<u>Vibrio</u> <u>coli</u>	<u>Mycoplas-</u> <u>ma</u> <u>hyo-</u> <u>pneumoniae</u>	<u>Hemophi-</u> <u>lus</u> <u>galli-</u> <u>narum</u>
0,78	3,12	>50,0	6,25	6,25	<0,78	3,12		<0,78		0,78	
3,12	1,56	50,0	3,12	6,25	1,56	3,12		3,12		3,12	
3,12	3,12	50,0	12,5	12,5	1,56	3,12		3,12		3,12	
6,25	6,25	50,0	6,25	6,25	6,25	6,25		6,25		3,12	
0,78	<0,78	25,0	1,56	6,25	1,56	6,25		<0,78	<0,78		
3,12	1,56	50,0	3,12	6,25	1,56	12,5		1,56		1,56	
1,56	1,56	50,0	3,12	6,25	1,56	12,5		1,56		1,56	
0,78		50,0	<0,78	6,25	<0,78	<0,78		1,56	<0,78	<0,78	6,25
0,78	<0,78	25,0	3,12	3,12	3,12	<0,78		1,56	<1,56	<0,78	6,25
0,78	3,12	>50,0	25,0	12,5	12,5	12,5		12,5	3,12	12,5	50,0
0,0	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0			>50,0	>50,0		
0,78	6,25	12,5	25,0	>50,0	>50,0	50,0		25,0	<0,78	>50,0	
3,12	12,5	>50,0	25,0	50,0	12,5	25,0		12,5	<0,78	25,0	50,0
0,78	1,56	>50,0	3,12	6,25	3,12	3,12		<0,78	>1,56	<0,78	12,5
1,56	1,56	50,0	6,25	12,5	3,12	3,12		6,25		1,56	
5,0	25,0	50,0	50,0	12,5	1,56	3,12		12,5		3,12	



1 En la Tabla II, la Columna 1 contiene el compuesto  
 de ensayo; la Columna 2, la dosis del compuesto de ensayo en  
 mg/kg de peso corporal del ratón; la Columna 3, la dilución  
 del organismo de ataque; y la Columna 4, la relación entre el  
 5 número de ratones que sobreviven al ensayo a cada dosis y  
 dilución de ataque y el número de ratones ensayados a cada  
 dosis y dilución de ataque, denominada relación de supervi-  
 vencia.

TABLA II

	<u>Compuesto</u>	<u>Dosis, mg/kg</u>	<u>Dilución de ataque</u>	<u>Relación de supervi- vencia.</u>
10	2	5,0	10 <sup>-4</sup>	3/15
			10 <sup>-5</sup>	5/15
			10 <sup>-6</sup>	5/15
15	3	5,0	10 <sup>-4</sup>	1/20
			10 <sup>-5</sup>	4/20
			10 <sup>-6</sup>	5/20
		2,5	10 <sup>-4</sup>	3/10
			10 <sup>-5</sup>	1/10
			10 <sup>-6</sup>	2/10
20	4	5,0	10 <sup>-4</sup>	4/10
			10 <sup>-5</sup>	5/10
			10 <sup>-6</sup>	5/10
25	4a	5,0	10 <sup>-4</sup>	7/10
			10 <sup>-5</sup>	7/10
			10 <sup>-6</sup>	7/10
	5	5,0	10 <sup>-4</sup>	3/10
			10 <sup>-5</sup>	6/10
			10 <sup>-6</sup>	9/10
30	6	5,0	10 <sup>-4</sup>	2/10

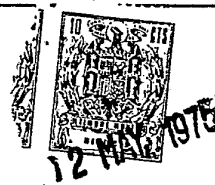


TABLA II (continuación)

	<u>Compuesto</u>	<u>Dosis,</u> <u>mg/kg</u>	<u>Dilución</u> <u>de ataque</u>	<u>Relación de su-</u> <u>pervivencia</u>
1			$10^{-5}$	2/10
5	7	5,0	$10^{-6}$	2/10
			$10^{-4}$	4/10
			$10^{-5}$	7/10
			$10^{-6}$	10/10
		2,5	$10^{-4}$	1/5
10			$10^{-5}$	2/5
			$10^{-6}$	3/5
	8	5,0	$10^{-4}$	10/10
			$10^{-5}$	10/10
			$10^{-6}$	10/10
15		2,5	$10^{-4}$	2/5
			$10^{-5}$	3/5
			$10^{-6}$	5/5
		1,25	$10^{-4}$	1/5
			$10^{-5}$	2/5
20			$10^{-6}$	3/5
	8a	5,0	$10^{-4}$	2/5
			$10^{-5}$	1/5
			$10^{-6}$	5/5
	8d	5,0	$10^{-4}$	5/5
25			$10^{-5}$	5/5
			$10^{-6}$	5/5
	8g	5,0	$10^{-4}$	7/10
			$10^{-5}$	9/10
			$10^{-6}$	10/10
30		2,5	$10^{-4}$	2/10



1

TABLA II (continuación)

<u>Compuesto</u>	<u>Dosis, mg/kg</u>	<u>Dilución de ataque</u>	<u>Relación de su pervivencia</u>
		$10^{-5}$	6/10
		$10^{-6}$	10/10
5	9	5,0	$10^{-4}$ 10/10
		$10^{-5}$	8/10
		$10^{-6}$	9/10
	10	5,0	$10^{-4}$ 5/5
10		$10^{-5}$	4/5
		$10^{-6}$	5/5
	11	5,0	$10^{-4}$ 0/5
		$10^{-5}$	0/5
		$10^{-6}$	1/5
15	12	5,0	$10^{-4}$ 1/5
		$10^{-5}$	1/5
		$10^{-6}$	0/5
	13	5,0	$10^{-4}$ 1/10
		$10^{-5}$	5/10
20		$10^{-6}$	5/10
		2,5	$10^{-4}$ 1/5
		$10^{-5}$	1/5
		$10^{-6}$	3/5
	14	5,0	$10^{-4}$ 0/5
25		$10^{-5}$	1/5
		$10^{-6}$	2/5
	Controles infectados	0	$10^{-4}$ 6/70
			$10^{-5}$ 16/80
30			$10^{-6}$ 26/90



1

EXPERIMENTO 3

5

10

Se realiza un ensayo comparativo de la actividad in vivo de un compuesto y nitrofurazolidona (Furacin) cuando se administran en el agua de bebida para el tratamiento de la infección en ratones de Pasteurella multocida. El compuesto utilizado en este estudio fué difosfato de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(4-piridilmetil)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina identificado por su ejemplo operativo nº 8k. El ensayo se realizó de la siguiente forma.

15

Veinticuatro ratones hembra blancos, pesando cada uno de ellos alrededor de 15-20 g, se dividen en cuatro grupos de 5 ratones cada uno y cada uno de los grupos se somete a una medicación acuosa que contiene:

- a. Compuesto 8k, 0,5 g/galón (0,13 g/l)
- b. Compuesto 8k, 2,0 g/galón (0,53 g/l)
- c. Nitrofurazolidona, 0,5 g/galón (0,13 g/l)
- d. Nitrofurazolidona, 2,0 g /galón) (0,53 g/l).

20

Los grupos que reciben cada tratamiento son atacados con 0,1 ml cada uno de una dilución  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  o  $10^{-7}$  de un caldo de cultivo de 16 a 20 horas de P. multocida. Los grupos de ratones no tratados son atacados con diluciones logarítmicas en base 10 del mismo caldo de cultivo utilizando 0,1 ml de diluciones  $10^{-4}$  a  $10^{-9}$ . Se observan los ratones durante 7 días y después se calculan las  $DL_{50}$  para los diversos grupos tratados de ratones y las  $DL_{50}$  para el grupo de control de ratones. Substrayendo la  $DL_{50}$  de cada uno de los grupos tratados de la del grupo de ratones de control, se obtiene una cifra denominada índice protector. Cuanto mayor sea el valor del índice protector, más activo es el com-

25

30



1 puesto contra la infección.

Los resultados se encuentran en la tabla que sigue. En esta tabla, la Columna 1 indica el tratamiento; la Columna 2, la DL<sub>50</sub> y la Columna 3 el log<sub>10</sub> de la protección obtenida.

TABLA III

Tratamiento	Proporción, g/galón (g/l)	DL <sub>50</sub>	Indice de protección
8i	2,0 (0,53)	-	> 2,5
	0,5 (0,13)	-	> 2,5
Nitrofurazolidona	2,0 (0,53)	-	> 2,5
	0,5 (0,13)	10 <sup>-4,3</sup>	2,2
Controles no medicados		10 <sup>-6,5</sup>	-

EXPERIMENTO 4

15 La actividad in vitro de algunos de los compuestos contra dos bacterias patógenas de los peces fué determinada utilizando caldo de triptosa y el sistema normal de ensayo de dilución en tubo. Se prepararon diluciones dobles comprendidas entre 100,0 y 0,78 mcg/ml de cada uno de los compuestos de ensayo en porciones de 5 ml de caldo de triptosa. Después cada tubo de la serie fué inoculado con una gota de un caldo de cultivo de 24 horas de Pseudomonas sp. o una cepa de Aeromonas liquefaciens. Los tubos se incubaron durante la noche a unos 37°C y se determinó y registró la concentración mínima de inhibición (CMI).

25 Los resultados se encuentran en la siguiente Tabla IV. La Columna 1 contiene los compuestos de ensayo identificados por su número de ejemplo operativo; la Columna 2 contiene los valores CMI para Pseudomonas sp. y la Columna 3 contiene los valores CMI para Aeromonas liquefaciens.

30



1

TABLA IV

<u>Compuesto del Ejemplo nº</u>	<u>Pseudomonas, mcg/ml</u>	<u>Aeromonas li- quefaciens, mcg/ml</u>
2	50,0	50,0
5b	3,12	25,0
8	1,56	12,5
8k	0,78	50,0
9a	0,78	25,0
15b	1,56	50,0

5

10

EXPERIMENTO 5

Se determina la actividad in vitro contra Treponema hyodysenteriae, de varios compuestos representativos, a saber, 5b, 8 y 15b. El Treponema fué propagado sobre placas de ágar sangre. Cada placa preparada contenía 20 ml de ágar soja tripticasa (Baltimore Biological Laboratory [BBL]) con 5,0 g/l de extracto de levadura (Difco) y 5 % de sangre de caballo desfibrinada estéril. Las placas eran placas Petri de plástico estéril, de 15 x 100 mm. La incubación se realizó a 37°C durante 4 días en condiciones anaerobias, empleando el sistema Gas Pak BBL.

15

20

Las concentraciones de los compuestos de ensayo en esta prueba inicial se prepararon a diluciones comprendidas entre 2000 mcg/ml y 7,8 mcg/ml. El procedimiento de ensayo se llevó a cabo de la siguiente forma. Se mezclaron 5 ml de una concentración a 20 veces en caldo de triptosa (Difco) de cada dilución del compuesto de ensayo esterilizada por filtración en una serie de matraces que contenían 90 ml de ágar soja tripticasa fundido con extracto de levadura. Después se añadieron 5 ml de sangre de caballo por matraz. A continuación se utilizó el contenido de estos matraces para

25

30



1 preparar una serie de placas de ágar sangre en diluciones do-  
bles decrecientes comprendidas entre 100 mcg/ml y 0,39 mcg/ml.

5 El treponema para inocular estas placas se obtuvo  
por adición de 3,0 ml de caldo estéril de triptosa a la su-  
perficie de una placa sobre la que se había propagado el tre-  
ponema. Se utilizó una hila estéril con punta de algodón pa-  
ra desprender el treponema del ágar. Después esta suspensión  
se diluyó cien veces y cada una de las placas que contenía  
10 los compuestos de ensayo fué inoculada con 0,01 ml junto  
con las placas de control que no contenían compuestos de en-  
sayo. El inoculum se extendió de manera que cubría la super-  
ficie de cada placa, utilizándose una pipeta curvada estéril  
de plástico para este fin para cada placa. Las placas se in-  
cubaron a unos 36°C durante 4 días aproximadamente y después  
15 se examinó el crecimiento del treponema. La concentración  
mínima de inhibición (CMI) de cada compuesto de ensayo es la  
concentración que evitaba el crecimiento de treponema.

20 Estos compuestos representativos inhiben todos el cre-  
cimiento del treponema a cada uno de los niveles ensayados y  
la CMI para estos compuestos es  $\leq 1,56$  mcg/ml.

Algunos de los compuestos son activos in vivo contra  
Salmonella typhimurium en pollos cuando se administran a los  
mismos subcutáneamente.

25 6-etil-1,5-dihidro-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-  
2-il)-4H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona

5-[2-(dimetilamino)etil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-  
3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimi-  
dina

30 1,5-dihidro-1,6-dimetil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-  
il)-4H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona.



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

Estos compuestos pueden ser utilizados para tratar el S. typhimurium en pollos.

Algunos de los compuestos son activos in vitro e in vivo contra Trichomonas vaginalis. Estos compuestos son: 5-[2-(dimetilamino)etil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina, 5-[3-(dimetilamino)propil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina y 6-(clorometil)-6,7-dihidro-6-hidroxi-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4(5H)-ona, éster cloroacético.

A las vista de las actividades presentadas por estos compuestos en los ensayos antes descritos, los compuestos pueden ser utilizados para controlar T. vaginalis, P. multocida y S. typhimurium en los animales. Los compuestos también son útiles para combatir las bacterias patógenas de los peces identificadas como Pseudomonas sp. y Aeromonas liquefaciens, respectivamente.

Cuando los compuestos se utilizan para controlar P. multocida o T. vaginalis en los animales, pueden ser formulados como se ha descrito en el Experimento 2 anterior y administrados por inyección. Los compuestos también pueden ser administrados por vía oral, por ejemplo en el agua de bebida de los animales para el control de P. multocida.

El tratamiento de S. typhimurium en pollos se realiza incorporando el compuesto a la ración normal del pollo y dejando que los pollos se alimenten a placer. El compuesto se incorpora al pienso a niveles eficaces, adecuadamente del orden de 50 g por Tm a 100 g por Tm de pienso.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita

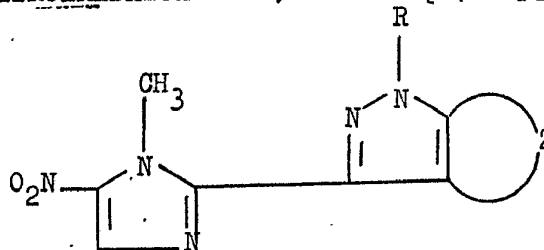


1975

1 deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la preparación de compuestos 3-(5-NITROIMIDAZOL-2-IL)PIRAZOLO [3,4-d]pirimidina de fórmula

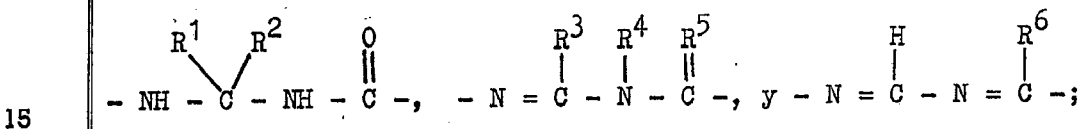


10

Fórmula I

donde

Z está seleccionado entre el grupo formado por



R es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>X;

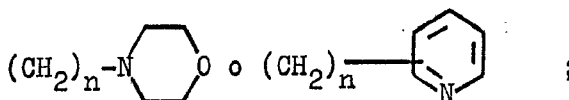
20 R<sup>2</sup> es -O-C(=O)-CH<sub>2</sub>X;

X es bromo, cloro, flúor o yodo;

R<sup>3</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o CF<sub>3</sub>;

R<sup>4</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH[O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)]<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH, 9-octadecenilo,

25



R<sup>5</sup> es NH u oxígeno;

R<sup>6</sup> es NH<sub>2</sub>, NHCOCH<sub>3</sub>, NHCHCO<sub>2</sub>H o NHNH<sub>2</sub>;

30

R<sup>7</sup> es hidrógeno o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>;

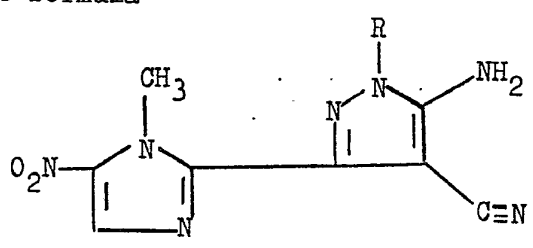


1

n es 1, 2, 3 o 4;

cuyo procedimiento se caracteriza por hacer reaccionar un compuesto de fórmula

5

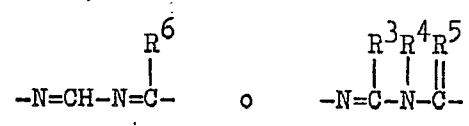


Fórmula II

10

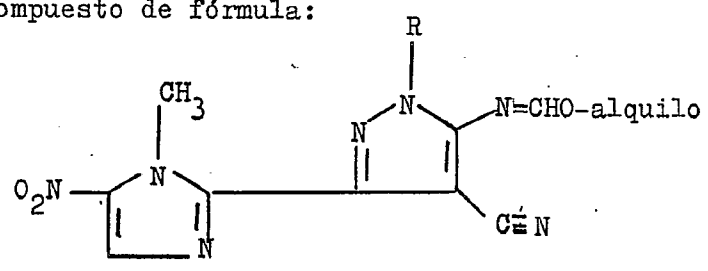
donde R es el definido anteriormente con (a) un ácido orgánico, un anhídrido orgánico o anhídrido cloroacético o (b) cuando Z es

15



donde R<sup>3</sup> es hidrógeno, R<sup>4</sup> es distinto de hidrógeno y R<sup>5</sup> es NH o R<sup>6</sup> es el definido anteriormente, con un ortoformiato de trialquilo, en presencia de anhídrido acético, para formar un compuesto de fórmula:

20



Fórmula III

25

donde alquilo es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y después hacer reaccionar el compuesto de Fórmula III con una amina primaria orgánica.

Handwritten signature and the number 30.

30

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación de 1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4(5H)-ona, caracterizado por hacer reaccionar 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)



1973

1 pirazol-4-carbonitrilo con ácido fórmico a temperatura elevada.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación de 6-etil-1,5-dihidro-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-4H-pirazolo [3,2-d] pirimidin-4-ona, caracterizado por hacer reaccionar 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo con anhídrido propiónico, a temperatura elevada.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación del éster cloroacético de la 6-(clorometil)-6,7-dihidro-6-hidroxi-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4(5H)-ona, caracterizado por hacer reaccionar 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo con ácido cloroacético, en presencia de ácido sulfúrico, en un disolvente a temperatura elevada.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-propil-1H-pirazolo-[3,4-d] pirimidina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato de metilo con n-propilamina y etanol.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación de 4-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato de metilo con hidróxido amónico y etanol, a temperatura elevada.

7. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación de N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-il] acetamida, caracterizado por

*[Handwritten signature]*  
30



MAY 1975

1 hacer reaccionar 4-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-  
2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina con anhídrido acético, a  
temperatura elevada.

5 8. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-  
il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidin-4-il] glicina, caracterizado  
por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-  
2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato de metilo con glicina  
y carbonato sódico en etanol y agua, a temperatura elevada.

10 9. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de N-[1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-  
il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidin-4-il] metionina, caracteriza-  
do por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-  
2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato de metilo con metionina  
15 y carbonato sódico en etanol y agua, a temperatura elevada.

20 10. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de dietilacetal de 4-imino-1-metil-3-(1-metil-  
5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidin-5(4H)-ace-  
taldehido, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-  
metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimi-  
dato de metilo con dietilacetal de aminoacetaldehido en etanol.

25 11. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la  
preparación de 5-etil-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-  
5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina, caracte-  
rizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-  
nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato de metilo con  
etilamina en etanol, a temperatura elevada.

30 12. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 5-[2-(dimetilamino)etil]-4,5-dihidro-4-imi-  
no-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]



1 pirimidina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-  
metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimida-  
to de metilo con dimetiletilendiamina asimétrica en etanol.

5 13. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 5-[2-(dietilamino)etil]-4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-  
metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimida-  
to con dietiletilendiamina asimétrica en etanol.

10 14. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-  
nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-5-etanol,  
caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-metil-3-(1-  
metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato con eta-  
nolamina en etanol.

15 15. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-  
nitroimidazol-2-il)-5-(9-octadecenil)-1H-pirazolo [3,4-d] piri-  
midina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-metil-  
20 3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato con  
9-octadecenilamina en etanol.

25 16. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-  
nitroimidazol-2-il)-5-(4-piridilmetil)-1H-pirazolo [3,4-d] pi-  
rimidina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-me-  
til-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]formimidato  
con 4-piridilmetilamina en etanol.

30 17. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-ni-  
troimidazol-2-il)-5-(2-piridilmetil)-1H-pirazolo [3,4-d] piri-



1 midina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-me-  
til-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimidato  
con 2-piridilmetilamina en etanol.

5 18. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 4,5-dihidro-4-imino-1-metil-3-(1-metil-5-  
nitroimidazol-2-il)-5-(3-piridilmetil)-1H-pirazolo [3,4-d] pi-  
rimidina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-ciano-1-  
metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il] formimi-  
dato con 3-piridilmetilamina en etanol.

10 19. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 4-hidrazino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimi-  
dazol-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina, caracterizado por  
hacer reaccionar N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imi-  
dazolil)pirazol-5-il]formimidato de metilo con hidrazina en  
15 etanol.

20 20. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 5-[3-(dimetilamino)propil]-4,5-dicloro-4-  
imino-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-1H-pirazolo  
[3,4-d]pirimidina, caracterizado por hacer reaccionar N-[4-  
ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-5-il]  
formimidato de butilo con 3-aminopropildimetilamina en eta-  
nol, a temperatura elevada.

25 21. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 1,5-dihidro-1-metil-3-(1-metil-5-nitroimi-  
dazol-2-il)-6-(trifluormetil)-4H-pirazolo [3,4-d]pirimidin-  
4-ona, caracterizado por hacer reaccionar 5-amino-1-metil-3-  
(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo con anhí-  
drido trifluoracético, a temperatura elevada.

30 22. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de 1,5-dihidro-1,6-dimetil-3-(1-metil-5-nitro-



1 imidazol-2-il)-4H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona, caracteri-  
zado por hacer reaccionar 5-amino-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-  
2-imidazolil)pirazol-4-carbonitrilo con ácido sulfúrico en  
5 te carboxamida y hacer reaccionar la carboxamida con anhídri-  
do acético a temperatura elevada.

23. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación de dihidrocloruro de 4,5-dihidro-4-imino-1-me-  
til-3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)-5-(2-morfolinoetil)-1H-  
10 pirazolo [3,4-d] pirimidina, caracterizado por hacer reaccio-  
nar N-[4-ciano-1-metil-3-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)pira-  
zol-5-il] formimidato de metilo con N-(2-aminoetil)morfolina  
en etanol.

24. Se reivindica por último como objeto sobre el  
15 que ha de recaer la patente de invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE COMPUESTOS 3-(5-NITROI  
MIDAZOL-2-IL)PIRAZOLO [3,4-d]PIRIMIDINA.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente memoria descriptiva que consta de sesenta y una pá-  
20 ginas mecanografiadas.

Madrid, 12 mayo 1.975  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.

25

30