

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

2020
Bogotá D.C.,

Abogado
Jaime Eduardo Delgado Villegas.
mde@mdelaw.com; mde@mde.com

ASUNTO	Radicación	09 063 290
	Trámite	011
	Evento	378
	Actuación	519
	Oficio	
	Folios	13

EE- 17 2 4 8

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (Fase Nacional)	☒	Cap. I	☒
		Cap. II	☐

No. Solicitud Internacional PCT/EP2007/010839
Fecha de Presentación Internacional 12/Diciembre/2007

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 227 a 496	18/Junio/2009
Reivindicaciones:	Folios 497 a 508	18/Junio/2009
Prioridad:	DE102006060230.7	20/Diciembre/2006
	DE102007003036.5	20/Enero/2007

2. Análisis de la Prioridad

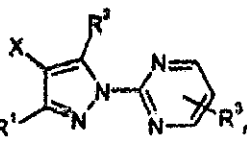
Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Pirimidinilpirazoles como principios activos insecticidas y parasiticidas".

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de nuevos compuestos insecticidas y parasiticidas, que se puedan usar en la fitoprotección, en la higiene veterinaria y en la protección de materiales para el combate de parásitos dañinos no deseados.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona
Expediente 09 063 290 1er Art 45



pirimidinilpirazoles de la fórmula (I) R^1 R^2 R^3 , donde los radicales están debidamente definidos (folios 228 a 230) como insecticidas y/o parasiticidas.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A 01 N 43/54 // C 07 D 403/04.

4. Relvindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El uso de la reivindicación 12 no es patentable, de acuerdo con el Art 14.

El procedimiento de la reivindicación 13, corresponde al uso de compuesto de de fórmula (I), mencionado en las reivindicaciones 1 a 4 para combatir parásitos dañinos animales. Es evidente que la llamada etapa de "dejar actuar sobre parásitos dañinos animales y/o su hábitat y/o simientes" corresponde a la forma de usar el compuesto de fórmula I, aunque en su preámbulo se reclame como procedimiento. Se le aclara al solicitante que un procedimiento cuya única etapa corresponde a una aplicación, dicha aplicación es un uso.

Por lo tanto dicho procedimiento no es patentable de acuerdo con el artículo 14.

5. De la Solicitud de Patente

Título

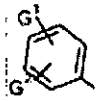
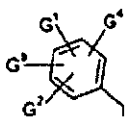
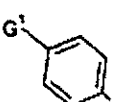
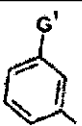
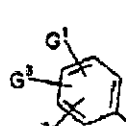
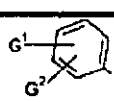
El título no corresponde con el objeto de la solicitud porque es muy general, ya que existen muchos derivados de pirimidinilpirazoles, se debe ser más específico con la o las sustituciones principales del compuesto de interés, por lo cual se sugiere al Solicitante hacer la corrección necesaria.

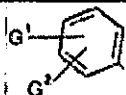
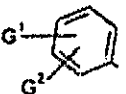
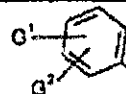
Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Las reivindicaciones 1 a 4 no se encuentran debidamente soportadas en la descripción puesto que en las realizaciones preferidas sólo hace referencia a la preparación de los compuestos mencionados en la tabla 1, lo cual no evidencia la actividad de todos los compuestos. Se sugiere restringir la solicitud a una razonable cantidad de acuerdo al tipo de compuestos que ha sido sintetizado y probado, es decir, que se encuentran debidamente soportados en el capítulo descriptivo. Teniendo en cuenta la descripción en los ejemplos se encuentra:

Tabla 1. Ejemplos de los compuestos soportados

Sustituciones	Soporte de los ejemplos presentados
R^1	CF_3
R^2	NH_2 , $NHCH_3$, NHC_2H_5
R^3	F

Sustituciones	Soporte de los ejemplos presentados	
n	0, 1	
X		G ¹ : 4-F, 3-Cl, 4-Cl, 4-Br, 4-I, 2-F, 2-Cl, 3-F, 3-Br G ² : H, 3-F, 4-F, 3-Cl, 4-Cl, 5-Cl, 6-Cl, 4-Br, 5-Br, 6-Br
		G ¹ : 2-F, 3-F, 3-Cl, 2-Cl G ² : 3-F, 4-F, 4-Cl G ³ : 5-F, 6-F, 5-Cl, 3-Cl G ⁴ : H, 3-Cl
		G ¹ : 2-CF ₃ , 3-CF ₃ , 4-CF ₃ , 5-CF ₃ G ² : H, 5-CF ₃ , 3-Cl, 2-Cl, 4-Cl, 5-Cl, 4-F, 5-F, 2-Br, 2-F
		G ¹ : 3-OCHF ₂ , 4-OCHF ₂ , 3-OCF ₃ , 4-OCF ₃ , 4-OCF ₂ Cl, 4-OCH ₂ CF ₃ G ² : H, 4-F, 3-F, 4-Cl, 5-Cl, 4-CF ₃ , 3-Cl
		G ¹ : Me, iPr, tBu, OMe, OMe, OEt, OiPr, OCH ₂ cpentilo, O-(3-Cl-5-CF ₃ -2-piridilo), SMe, SMe, SO ₂ Me, SCF ₃ , NMe ₂
		G ¹ : Me, SCF ₃ , CN, NO ₂
		G ¹ : 3-Me, 3-OMe, 3-F, 3-Cl, 3-Br, 2-OMe, 2-Cl, 2-F, 2-Br, 4-OCHF ₂ , 3-OEt G ² : 4-Me, 5-Me, 4-OMe, 4-OEt, 5-Me, 4-Me, 5-Br, 5-Cl, 3-OMe, 3-F, 4-Br, 4-OnPr, 4-OiPr, 5-OCF ₃ , 5-CF ₃ G ³ : H, 5-OMe, 5-Cl, 4-OMe G ¹ y G ² : 3, 4-(O-CH ₂ -CH ₂ -O)
		G ¹ +G ² : 3,4-C ₄ H ₈ , 3,4-OCH ₂ O, 3,4-OC ₂ H ₄ O, 3,4-OCF ₂ O
		G ¹ : 3-Cl, 3-I, 4-I, 3-OCF ₃ , 5-Cl, H, 4-F, 4-Me, 4-Cl, 4-OMe, 3-CF ₃ G ² : H, 5-Cl, 4-F, 3-Cl, 4-Cl, 4-OCHF ₂ , 2-F, 3-OMe, 3-OCF ₃ , 3-F, 4-Br, 5CF ₃ G ³ : H, 5-F R ² : NMe ₂ , NEt ₂ , NHnPr, NHiPr, NHCH ₂ fenilo, NH ₂ cPr, NHCH ₂ CH=CH ₂ , NHCH ₂ -4-Cl-Ph, NHCOCH ₃ , N(COCH ₃) ₂ , NHCOOEt, N(COC ₂ H ₅) ₂ , NCO ₂ CH ₂ CCH
		G ¹ : 4-Cl, 3-Cl, 4-Br G ² : H, 4-Cl R ² : Cl, NH-CO-COOMe
		G ¹ : 4-Cl, 3-Cl, 4-I, 4-Br, 3-OCF ₃ , 3-CF ₃ , 3-Br, 3-F, 2-Cl, 6-NMe ₂ , 6-OMe G ² : H, 5-Cl, 4-Cl, 5-Br, 5-OCF ₃ , 4-Br, 5-CF ₃ , 4-F R ¹ : CH ₂ F, CHF ₂ , CClF ₂ , CBrF ₂ , CF ₂ Br, Me, Et, nPr, iPr, nBu, iBu, tBuCH ₂ , CH ₂ OMe, CH ₂ OEt, CH ₂ SMe, CH(OMe)Me, CHFCH ₃ , CF ₂ CH ₃ , CF ₂ CF ₃ , CF(CH ₃) ₂ , CH ₂ CH ₂ CF ₃ , CHFC ₂ H ₅ , CHFnPr, CH ₂ CH(CF ₃)CH ₃ , CF ₂ CF ₂ OMe, CF ₂ CH ₂ Br, (S)-CHFCH ₃ , CF ₃ , ciclopipilo, C ₆ H ₅ -CH ₂ , 3-Cl-C ₆ H ₄ -CH ₂ , 2-F-C ₆ H ₄ -CH ₂ ,

Sustituciones	Soporte de los ejemplos presentados	
 y R³ con varias opciones  R¹: CH₃ y R²: NHC₂H₅  R¹ y R² con varias opciones	3-F-C₆H₄-CH₂, 3-CF₃-C₆H₄-CH₂, 2,4-Cl₂-C₆H₃-CH₂, 2-Br-C₆H₄-CH₂, 2-CH₃-C₆H₄-CH₂, 3-CH₃-C₆H₄-CH₂, 4-MeO-C₆H₄-CH₂, C₆H₅-CH₂CH₂CH₂ G¹: 3-Cl, 4-Cl, 4-Br G²: 5-Cl, H, 4-Cl R³: 5-Me, 5-F, 5-Cl, 5-CF₃, 5-OCH₃	
	G ¹ : 4-Cl, 2-Cl	
	G ² : H, 4-F	
	G ² : H, 4-F, 4-Cl	
	R ² : NHnPr, NHiPr, NHCH ₂ fenilo, NHCH ₂ cPr, NHCH ₂ C=Me ₂ , NHCH ₂ CO ₂ Et, NHnBu, NHIBu, NHCOCH ₃	
	G ¹ : 3-Cl	
	G ² : 5-Cl	
	R ¹ : CH ₂ F, CFIF ₂	
	R ² : NHCH ₂ Ph, NEt ₂	

El solicitante debe definir específicamente la materia y el alcance de la invención a través de las características técnicas esenciales que se encuentren enteramente soportadas en la descripción.

La reivindicación 1 no es concisa porque R¹, R², R³, y X, se definen de manera imprecisa, puesto que en los grupos funcionales, alquilo, haloalcoxi, alquilsulfonilo, dialquilamino, cicloalquilamino, entre otros no se menciona el número de átomos. Se sugiere colocar el número de átomos de cada grupo funcional en la reivindicación 1 que es donde se deben incluir todos los elementos esenciales del compuesto que se reclama.

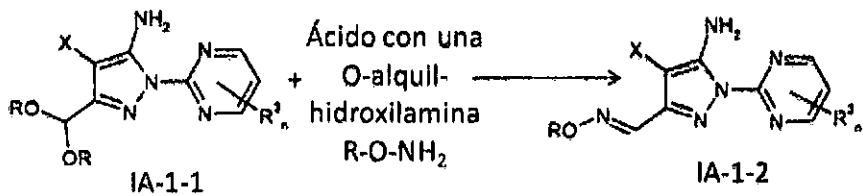
Las reivindicaciones 1 y 2 no son claras porque la expresión: “uno o varios” precediendo una característica no es precisa, porque hace opcional a las características y no limita el alcance de la reivindicación. Se sugiere cambiar el término precisando más.

En la reivindicación 4 se mencionan una serie de condiciones que no todas se cumplen, de ser parte importante de la invención se debe restringir la reivindicaciones precedentes 1 a 3 teniendo en cuenta dichas características, ya que dichas reivindicaciones no cumplen a cabalidad las condiciones mencionadas en la reivindicación 4.

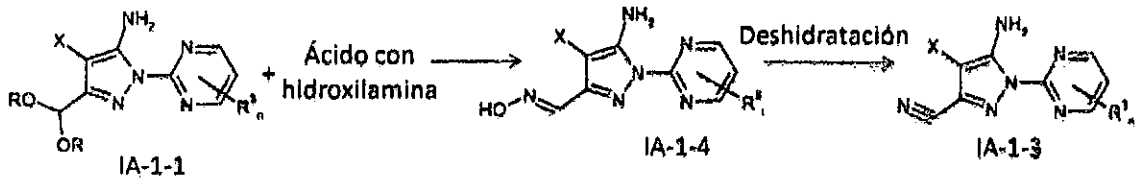
La reivindicación 7 no es concisa cuando se encuentran expresiones como: sustancias tensioactivas, extensores, porque no se define un componente como tal y no permite delimitar de manera adecuada el alcance de la invención. Se sugiere al solicitante definir estas expresiones de manera apropiada con constituyentes específicos.

6. Unidad de invención (Art 25 D 486)

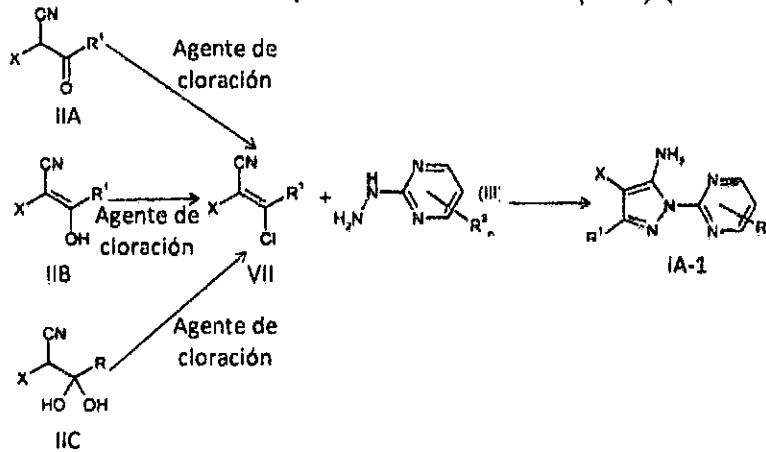
Teniendo en cuenta que el objeto de invención está definido por compuestos de fórmula I, como insecticidas y/o parasiticidas, después de una comparación con el estado del arte se encontró que dicha fórmula no se puede considerar el elemento unificador que relaciona todos los procedimientos de la invención, puesto que el



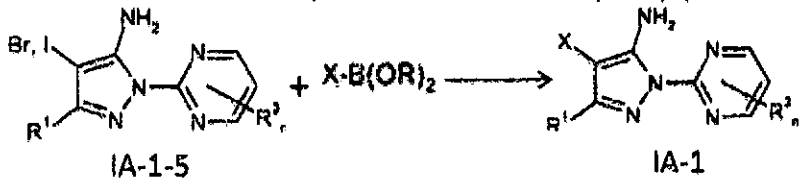
6° Proceso para preparar compuestos de fórmula (IA-1-3) (reivindicación 9)



7° Proceso para la síntesis de compuestos de fórmula (IA-1) (reivindicación 10)



8° Proceso para la síntesis de compuestos de fórmula (IA-1) (reivindicación 11)



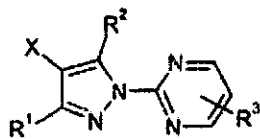
7. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la Fecha de Presentación de la Solicitud de Prioridad: Diciembre 20 de 2006 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Item	Documento	Título	Fecha de Publicación*
D1	US2004102465	Pyrazolyl pyrimidines	30/noviembre/2006
D2	Aggarwal Ranjana et Al, Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol 14, N°6, pages 1785 – 1791	Synthesis and antibacterial activity of some new 1-heteroaryl- 5-amino-3H/methyl-4 - phenylpyrazoles	21/noviembre/2005

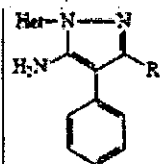
D1

http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=8&NP=4&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20040527&CC=US&NR=2004102465A1&KC=A1 divulga (página 1, párrafos [0004] – [0024]; página 2, párrafo [0025] – [0046]; página 25, párrafos [0501] – [0508]; página 25 a página 26, párrafo [0510]; página 76, reivindicación 14) un compuesto de fórmula (I)



los cuales son usados como pesticidas, en el cual R^1 y R^2 independientemente uno del otro son H, halógeno, nitro, halogenoalquil, $-NR^4R^5$, donde R^4 y R^5 : alquil, entre otros, entre otros sustituyentes; X representa aril, arilalquil, opcionalmente sustituido por halógeno, alquil, entre otros, $-S(O)_pR^3$, donde R^3 es aril saturado o insaturado, entre otros, $-COR^6$, $-CSR^6$, donde R^6 es arilalquil, entre otros, y otros sustituyentes; n representa 0,1, 2 ó 3, donde X representa diferentes o idénticos radicales si n es 2 ó 3; Y; Z y R están debidamente definidos. Además de las composiciones y preparación de las mismas.

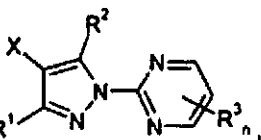
D2
Divulga (folio 584, página 1786, esquema 1; folio 585, página 1787, tabla 1) la



síntesis de un compuesto de fórmula 3 y actividad, donde R es CH_3 , H; Het: 4,6-dimetilpirimidin-2-il, entre otros; los cuales presentan una actividad antibacterial.

8. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

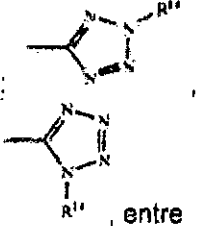
Nivel Inventivo (Art18 D486)



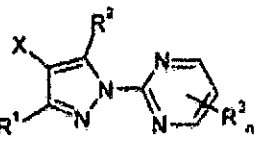
La reivindicación 1 consiste en un compuesto de fórmula (I) R^1 , R^2 , R^3 , X y n están definidos (ver folios 497 – 499).

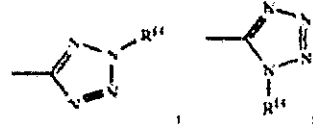
Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

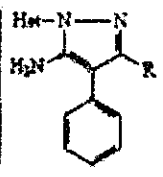
Características esenciales	D1	D2
compuesto de fórmula (I) 	Pirazoilpirimidinas sustituidas de fórmula (I)	Estructura 3
X: fenilo, 2-piridilo, 3-piridilo, en cada caso sustituido con uno o varios sustituyentes seleccionados de halógeno, alquilo, haloalquilo, alcoxi, alquilsulfonilo, entre otros.	X: aril, arilalquil, opcionalmente sustituido por halógeno, alquil, entre otros, $-S(O)_pR^3$ (R^3 : aril saturado o insaturado, entre otros), $-COR^6$, $-CSR^6$ (R^6 : arilalquil, entre otros), entre otros	
R^1 : alquilo eventualmente mono o disustituido con hidroxí, entre otros, bencilo (eventualmente sustituido), haloalquilo, entre otros	n: 0,1, 2 ó 3, donde X: diferentes o idénticos radicales si n es 2 ó 3	R: CH_3
R^2 : amino, amino monosustituido con alquilo, alquenilo, entre otros, amino disustituido con alquilo, alcoxi carbonilo, entre otros, halógeno, piperidina, entre otros		$-NH_2$

R^3 : halogeno, alquilo, haloalquilo, alcoxi o dialquilamino	R^1 y R^2 : independientemente uno del otro H, halógeno, nitro, halogenoalquil, $-NR^4R^5$ (R^4 y R^5 : alquil, entre otros)		Het: 4,6-dimetilpirimidin-2-
n: 0 ó 1	$Y \text{---} Z \text{---} R$	Y: enlace directo, oxígeno, $-S(O)_p$ - ó $-NR^9$ -, p es 0, 1 ó 2	
		Z: $-(CH_2)_p$ -, $-(CH_2)_l$ -, $(CH_2)-(CH_2)_w$, entre otros	
		R :  entre otros	

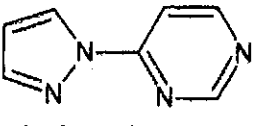
Teniendo en cuenta el grupo 1°, conformado por los compuestos de fórmula I, es posible concluir que los documentos del estado de la técnica cercanos a la invención corresponden a D1 y D2 porque:

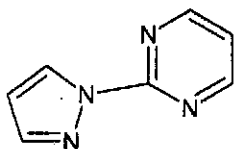
D1 divulga un compuesto de fórmula (I) , los cuales son usados como pesticidas, en el cual R^1 y R^2 independientemente uno del otro son H, halógeno, nitro, halogenoalquil, $-NR^4R^5$, donde R^4 y R^5 : alquil, entre otros, entre otros sustituyentes; X representa aril, arilalquil, opcionalmente sustituido por halógeno, alquil, entre otros, $-S(O)_pR^3$, donde R^3 es aril saturado o insaturado, entre otros, $-COR^6$, $-CSR^6$, donde R^6 es arilalquil, entre otros, y otros sustituyentes; n representa 0, 1, 2 ó 3, donde X representa diferentes o idénticos radicales si n es 2 ó 3; Y representa un enlace directo, oxígeno, $-S(O)_p$ - ó $-NR^9$ -, p es 0, 1 ó 2; Z representa $-(CH_2)_p$ -, $-(CH_2)_l$ -, $(CH_2)-(CH_2)_w$ -, entre otros; R representa

, entre otros (página 1, párrafos [0004] – [0024]; página 2, párrafo [0025] – [0046])

D2 divulga la síntesis de un compuesto de fórmula 3  y actividad, donde R es CH_3 , H; Het: 4,6-dimetilpirimidin-2-il, entre otros (folio 584, página 1786, esquema 1); los cuales presentan una actividad antibacterial (folio 585, página 1787, tabla 1).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el compuesto de D1 consiste en la posición que esta enlazado el pirazol a la pirimidina que para el

documento D1 es en la posición 4  (estructura de manera general), mientras que para la solicitud el pirazol esta enlazado en la posición 2



(estructura de manera general).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el compuesto de D2 consiste en el radical X que para la solcitud puede ser un fenilo sustituido, mientras que en el documento D2 en un fenilo sin sustituir.

El efecto que lograría las diferencias antes mencionada en el compuesto de fórmula I de la reivindicación 1, en cuanto a su actividad insecticida y/o parasiticida, no puede ser determinado toda vez que no existe alguna evidencia que indique que dichas diferencias estructurales, más específicamente en cuanto a posición de un pirazol para D1 o sustituciones en el fenilo para D2, otorgan al compuesto ahora reivindicado una ventaja técnica sobre los compuestos ya conocidos en las anterioridades D1 o D2.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo a resolver consiste en plantear una alternativa a los compuestos de fórmula I conocidos según D1 o D2 para que sea más eficiente su actividad como insecticida y/o parasiticida.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, la personas de nivel medio versada en la materia derivara de manera obvia los compuestos descritos en la reivindicación 1 de la presente invención a partir de las enseñanzas del documento D1 o D2, toda vez que estos se limitan a variaciones en la posición de uno de los sustituyentes o en la sustitución en un fenilo, de los compuestos divulgados respectivamente, sin que ese hecho confiera una mayor actividad como insecticida y/o parasiticida a los mismos.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 2 – 4 no mencionan características inventivas adicionales, tampoco pueden ser consideradas inventivas.

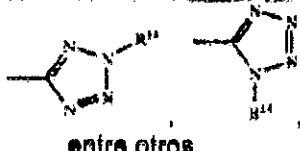
Conclusión:

Las reivindicaciones 1 – 4 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La **reivindicación 14** consiste en un "procedimiento para preparar composiciones agroquímicas, caracterizado porque se mezclan compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 con extensores y/o sustancias tensioactivas"

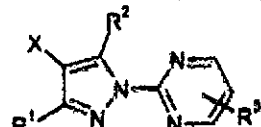
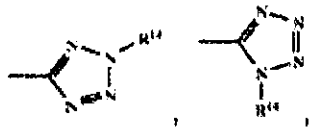
Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1
Procedimiento para preparar composiciones caracterizado	Proceso para preparar pesticidas, caracterizado
porque se mezclan compuestos de	Se mezclan Pirazolpirimidinas sustituidas de
fórmula (I)	fórmula (I)

X: fenilo, 2-piridilo, 3-piridilo, en cada caso sustituido con uno o varios sustituyentes seleccionados de halógeno, alquilo, haloalquilo, alcoxi, alquilsulfonilo, entre otros.	X: aril, arilalquil, opcionalmente sustituido por halógeno, alquil, entre otros, -S(O) _p R ³ (R ³ : aril saturado o insaturado, entre otros), -COR ⁶ , -CSR ⁶ (R ⁶ : arilalquil, entre otros), entre otros
R ¹ : alquilo eventualmente mono o disustituido con hidroxil, entre otros, bencilo (eventualmente sustituido), haloalquilo, entre otros	n: 0, 1, 2 ó 3, donde X: diferentes o idénticos radicales si n es 2 ó 3
R ² : amino, amino monosustituido con alquilo, alquenilo, entre otros, amino disustituido con alquilo, alcoxi carbonilo, entre otros, halógeno, piperidina, entre otros	
R ³ : halógeno, alquilo, haloalquilo, alcoxi o dialquilamino	R ¹ y R ² : independientemente uno del otro H, halógeno, nitro, halogenoalquil, -NR ⁴ R ⁵ (R ⁴ y R ⁵ : alquil, entre otros)
n: 0 ó 1	Y: enlace directo, oxígeno, -S(O) _p - ó -NR ⁹ -, p es 0, 1 ó 2
	Z: -(CH ₂) _p -, -(CH ₂) ₁ -(CH ₂) ₁ -(CH ₂) _w -, entre otros
	 R: entre otros
con extensores y/o sustancias tensioactivas	con extensores y/o tensioactivos

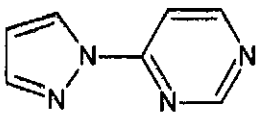
Teniendo en cuenta el grupo 1°, conformado por el proceso de preparación de composiciones que contienen compuestos de fórmula I, es posible concluir que las características **esenciales** del compuesto de la reivindicación 1 habian sido divulgadas previamente en D1.

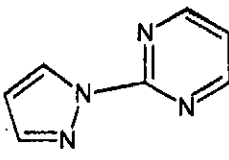
El documento D1, considerado el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1, divulga proceso para preparar pesticidas, caracterizado porque los compuestos de fórmula (I) son mezclados con extendedores y/o tensioactivos (página 76, reivindicación 14). Estas formulaciones contienen solventes líquidos, vehículos solido, tensioactivos, entre otros (página 25, párrafos [0501] – [0508]), además pueden tener otros compuestos activos (página 25 a página 26, párrafo [0510]). Donde el compuesto

de fórmula (I) esta representado , donde R¹ y R² independientemente uno del otro son H, halógeno, nitro, halogenoalquil, -NR⁴R⁵, donde R⁴ y R⁵: alquil, entre otros, entre otros sustituyentes; X representa aril, arilalquil, opcionalmente sustituido por halógeno, alquil, entre otros, -S(O)_pR³, donde R³ es aril saturado o insaturado, entre otros, -COR⁶, -CSR⁶, donde R⁶ es arilalquil, entre otros, y otros sustituyentes; n representa 0, 1, 2 ó 3, donde X representa diferentes o idénticos radicales si n es 2 ó 3; Y representa un enlace directo, oxígeno, -S(O)_p- ó -NR⁹-, p es 0, 1 ó 2; Z representa -(CH₂)_p-, -(CH₂)₁-(CH₂)₁-(CH₂)_w-, entre otros; R representa , entre otros (página

1, párrafos [0004] – [0024]; página 2, párrafo [0025] – [0046])

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 14 y proceso de D1 es en el compuesto de fórmula (I) puesto que se presenta una diferencia en la posición que esta enlazado el pirazol a la pirimidina que para el documento D1 es

en la posición 4  (estructura de manera general), mientras que

para la solicitud el pirazol esta enlazado en la posición 2  (estructura de manera general).

El efecto que lograría las diferencias antes mencionada en el proceso de la reivindicación 14, en cuanto a su actividad insecticida y/o parasitocida, no puede ser determinado toda vez que no existe alguna evidencia que indique que dichas diferencias estructurales, más específicamente en cuanto a posición de un pirazol para D1, otorguen al proceso ahora reivindicado una ventaja técnica sobre el proceso ya conocido en la anterioridad D1, puesto que la etapa principal del proceso es la de mezclar los ingredientes y esta se encuentra mencionada en D1.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo a resolver consiste en plantear una alternativa al proceso que contiene los compuestos de fórmula I conocido según D1 para que sea más eficiente su actividad como insecticida y/o parasitocida.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, la personas de nivel medio versada en la materia derivara de manera obvia el proceso de la reivindicación 14 de la presente invención a partir de las enseñanzas del documento D1, toda vez que la variación se presenta en el compuesto de fórmula (I) donde se limitan a variaciones en la posición de uno de los sustituyentes, de los compuestos divulgados respectivamente, sin que ese hecho confiera una mayor actividad como insecticida y/o parasitocida a los mismos, ya que la etapa fundamental de mezclar los ingredientes se encuentra divulgada.

Conclusión:
La reivindicación 14 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

9. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US2004102465	1 – 4 y 14	Nivel Inventivo
D2	Aggarwal Ranjana et Al, Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol 14, N°6, pages 1785 – 1791	1 – 4	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante y presentarla por escrito

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha
02 OCT, 2012

Elaborado por: Mayra Alejandra Quintero
Revisado por: Gloria Jacqueline Alfonso *xl*



Synthesis and antibacterial activity of some new 1-heteroaryl-5-amino-3*H*/methyl-4-phenylpyrazoles

Ranjana Aggarwal, Vinod Kumar, Parikshit Tyagi and Shiv P. Singh

^aDepartment of Chemistry, Kurukshetra University, Kurukshetra 136 119, India

^bDepartment of Microbiology, Kurukshetra University, Kurukshetra 136 119, India

Received 15 September 2005; revised 15 October 2005; accepted 17 October 2005

Available online 21 November 2005

Abstract—The regioselective synthesis of 1-heteroaryl-5-amino-4-phenylpyrazoles **3a–g** and 1-heteroaryl-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazoles **3h–n** was achieved by the treatment of heteroarylhydrazines **1a–g** with α -phenylformylacetonitrile **2a** and α -phenylacetylacetonitrile **2b**, respectively. The structures of the compounds **3** were established by the combined use of ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. All the fourteen compounds were tested for their in vitro antibacterial activity against three Gram-positive and two Gram-negative bacteria. Six compounds **3a**, **3d**, **3e**, **3g**, **3l**, and **3n** from this series were found to be equipotent or more potent than the commercial antibiotics (Linezolid and Cefroxime axetil).

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

5-Aminopyrazoles are an important class of compounds because of physiological properties associated with them. They display many diverse types of biological properties such as antibacterial¹, anti-inflammatory², and herbicidal activities,³ and have been extensively investigated over the past hundred years (e.g., antipyrine since 1884). They are also known to possess a good synthetic potential, especially in the preparation of condensed heterocycles such as pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines, imidazopyrazoles, etc., which are found to possess adenosine receptor affinity,⁴ anti-tumor activity⁵ besides being purine⁶ and folate antagonists.⁷ Urea derivatives of 5-aminopyrazoles have recently been reported as potent inhibitors of P^{38} kinase,⁸ $\text{TNF-}\alpha$ production,⁹ and cholesterol acyltransferase.¹⁰ In view of these observations and in continuation of our work related to heteroarylpyrazoles,¹¹ it was envisaged in the present investigation to undertake the synthesis

and evaluation of the antibacterial activity of some new 1-heteroaryl-5-amino-3*H*/methyl-4-phenylpyrazoles **3** with an expectation to find new and more potent antibacterial agents.

2. Chemistry

Synthesis of 1-heteroaryl-5-amino-4-phenylpyrazoles **3a–g** and 1-heteroaryl-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazoles **3h–n** is outlined in Scheme 1.

Starting compounds, α -phenylformylacetonitrile **2a** and α -phenylacetylacetonitrile **2b**, were readily prepared by the acylation of α -phenylacetonitrile with ethyl formate and ethyl acetate, respectively, in the presence of sodium ethoxide.¹² Refluxing **2** with heteroarylhydrazines **1** in ethanol provided 1-heteroaryl-5-aminopyrazoles in excellent yield. In principle, the reaction of heteroarylhydrazines and α -phenylacetylacetonitrile may lead to the formation of isomeric pyrazoles **3** and **4** through the pathways detailed in Scheme 2.

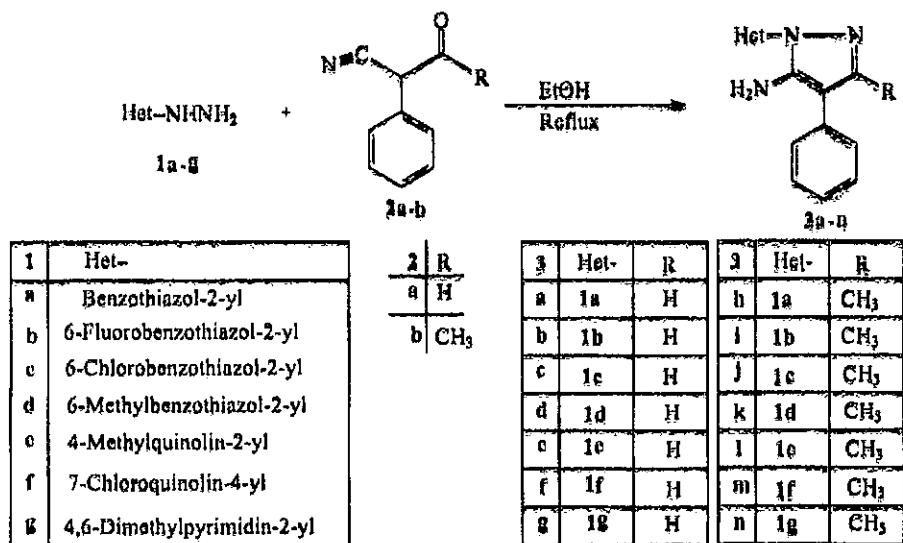
However, in the reaction of **1** with **2**, a single isomer was obtained in each case. The product may be one of the two possible isomers having H/CH_3 located either at position **3** or **5** of the pyrazole ring. The isomer was identified as **3** or **5** by combined use of ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy.

Abbreviations: MTCC, microbial type culture collection; SCDA, soyabean casein digest agar; EtOH, ethanol; MHA, Muller-Hinton agar; MIC, minimum inhibitory concentration.

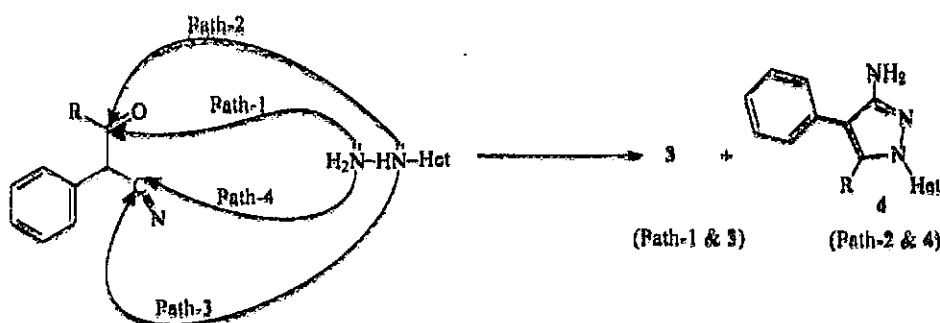
Keywords: 1-Heteroaryl-5-amino-4-phenylpyrazoles; 1-Heteroaryl-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazoles; NMR spectroscopy; Antibacterial activity.

* Corresponding author. Tel.: +91 1744238734; fax: +911744238277; e-mail: ranjana67@yahoo.com

584



Scheme 1.



Scheme 2.

The ^1H NMR spectra of 3a–g displayed the pyrazole proton appearing as a sharp singlet at δ 7.7 ppm, while in 3h–n, a singlet of three protons for methyl group appeared at δ 2.3 ppm. The chemical shifts of the pyrazole and methyl protons indicated that they are located at position 3 of the pyrazole ring. It has earlier been established in our laboratory that the H/methyl group located at position 3 of the pyrazole moiety resonates upfield as compared to position 5 (i.e., $\sim\delta$ 8.7 for $\text{C}_5\text{-H}/\sim\delta$ 2.7 for $\text{C}_5\text{-CH}_3$).¹³

The presence of H/Me group at position 3 and consequent location of the amino group at position 5 finds further support by the study of ^{13}C NMR spectra of compounds 3a–n. The compounds 3a–g and 3h–n displayed C-3 signal at δ 140–142 ppm and δ 149–152 ppm, respectively, and C-5 signal at δ 146–147 ppm which is a characteristic signal for C-5 bearing an amino group. These values are in complete agreement with earlier reports.^{1b,14,15} Had the H/Me group been located at position 5 and amino group at position 3 of pyrazole ring, the C-5 would have resonated at δ 129–130 ppm/ δ 140–142 ppm and C-3 at δ 156–157 ppm.^{16,17}

The presence of H/Me substituent at position 3 suggests that the carbonyl carbon of α -phenylacetonitrile is

more reactive toward nucleophiles than the cyano group and unsubstituted nitrogen of heteroarylhydrazine is involved in the initial reaction.

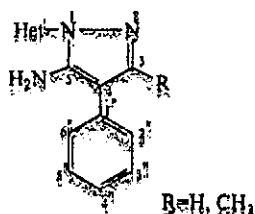
The complete assignment of the signals in ^{13}C NMR spectra of the compounds is given in Table 1.

IR spectra (in KBr) of all the compounds displayed the characteristic bands at 3280, 3380 cm^{-1} due to NH_2 str.

3. Biological results and discussion

All the 14 compounds were tested in vitro for their antibacterial activity against three Gram-positive bacteria namely, *Staphylococcus aureus* (MTCC 3160), *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 2639), and *Bacillus pumilus* (MTCC 1456), and two Gram-negative bacteria namely, *Salmonella typhi* (MTCC 733) and *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 3541) (Table 2). Six of these compounds 3a, 3d, 3e, 3g, 3l, and 3n exhibited good antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The compound 3n showed maximum antibacterial activity against *S. aureus* (MIC 0.5 $\mu\text{g/ml}$) and *S. epidermidis* (MIC 1 $\mu\text{g/ml}$). It also displayed inhibitory activity against *B. pumilus* (MIC 2 $\mu\text{g/ml}$) and *S. typhi* (MIC 4 $\mu\text{g/ml}$).

Table 1. ¹³C NMR data for some compounds (3)



Carbons	3a	3b	3d	3e	3f	3g	3h	3i	3j	3k	3l	3m
C-3	142.78	141.96	142.49	140.50	140.32	141.76	151.07	150.93	152.12	150.55	148.72	150.28
C-4	103.15	103.50	104.04	104.80	104.84	104.44	102.81	102.12	103.94	102.58	103.55	103.75
C-5	144.80	144.90	144.69	145.31	143.98	145.44	144.86	144.90	144.91	144.82	146.06	146.01
C-2'	161.93	160.50	161.04	153.40	151.05	168.42	161.25	160.55	162.11	160.33	153.01	168.28
C-3'	—	—	—	113.61	117.55	—	—	—	—	—	113.27	—
C-3'a	150.81	148.31	148.72	—	—	—	150.52	147.03	149.71	148.39	—	—
C-4'	121.79	121.71	121.30	145.51	149.71	157.66	121.07	121.87	122.36	120.61	145.25	157.46
C-4'a	—	—	—	125.44	122.28	—	—	—	—	—	125.67	—
C-5'	125.86	114.42	125.77	129.82	128.61	116.58	127.95	112.84	126.60	125.53	123.58	116.04
	(d, ² J _{C-F} = 24.25 Hz)							(d, ² J _{C-F} = 24.15 Hz)				
C-6'	124.57	159.12	134.56	125.66	127.90	157.66	123.72	159.07	132.13	133.54	126.81	157.46
	(d, ¹ J _{C-H} = 268.5 Hz)							(d, ¹ J _{C-H} = 268.7 Hz)				
C-7'	121.31	108.72	121.15	126.55	135.61	—	120.87	107.44	121.09	120.51	125.60	—
	(d, ² J _{C-F} = 27.51 Hz)							(d, ² J _{C-F} = 27.51 Hz)				
C-7'a	131.54	132.55	132.19	—	—	—	131.87	132.75	132.99	131.83	—	—
C-8'	—	—	—	129.82	125.63	—	—	—	—	—	129.49	—
C-8'a	—	—	—	147.42	143.07	—	—	—	—	—	146.95	—
C-1''	132.19	131.05	121.56	133.13	132.32	133.05	131.03	131.25	129.84	131.07	133.05	133.02
C-2'', 6''	129.02	128.80	128.75	128.73	128.61	129.04	128.95	128.25	128.48	128.22	128.79	128.82
C-3'', 5''	126.02	125.76	127.79	128.26	125.68	126.16	127.95	127.95	129.12	127.89	128.30	128.53
C-4''	126.44	125.51	125.93	126.10	125.41	125.71	125.80	125.58	127.00	127.06	127.94	126.03
3-CH ₃	—	—	—	—	—	—	12.81	12.68	13.26	12.58	13.26	13.53
CH ₃	—	—	21.35	18.72	—	24.12	—	—	—	—	18.73	24.10

* Carbons having single prime and double prime represent heteroaryl and phenyl carbons, respectively.

Table 2. In vitro antibacterial activity of 3a–n by using agar diffusion assay technique

Compound	Diameter of zone of growth inhibition (mm) ^a				
	Sa	Sc	Bp	St	Pa
3a	20 ± .81	24 ± .57	—	15.16 ± .37	15.83 ± .37
3b	—	—	—	—	—
3c	22.16 ± .37	15 ± .81	—	—	—
3d	20.83 ± .37	22 ± .81	—	18.16 ± .37	15 ± .81
3e	15.16 ± .37	20 ± .81	14.83 ± .37	15 ± .81	20.16 ± .37
3f	—	—	—	—	—
3g	18 ± .81	15.16 ± .37	—	14.83 ± .37	15.16 ± .37
3h	20.16 ± .37	15 ± .81	—	—	—
3i	—	—	—	—	—
3j	20 ± .57	20.16 ± .37	—	—	—
3k	—	—	—	—	—
3l	22.16 ± .37	15.83 ± .37	22.16 ± .37	15.83 ± .37	18 ± .57
3m	—	—	—	—	—
3n	40 ± .81	30 ± .57	25.16 ± .37	20.83 ± .37	15 ± .81
Ethanol	6.83 ± .37	6.83 ± .37	6.16 ± .37	6.83 ± .37	6.16 ± .37
Lincolid	22.83 ± .37	20 ± .81	15.16 ± .37	10.83 ± .37	12.83 ± .37
Cefixime axetil	10.83 ± .37	12.16 ± .37	10 ± .81	12.16 ± .37	10 ± .57

—, no activity.

Sa, *S. aureus* (MTCC 3160); Sc, *S. epidermidis* (MTCC 2639); Bp, *B. pumilus* (MTCC 1456); St, *S. typhi* (MTCC 733); and Pa, *P. aeruginosa* (MTCC 3541).

^a Mean of six replicates ± standard deviation.

Compound 3l was found to be effective against *S. aureus* and *B. pumilus* showing a MIC of 2 µg/mL. It also inhibited the growth *P. aeruginosa* at 4 µg/mL.

Compounds 3a and 3d displayed the same inhibitory activity against all the test organisms. They possess good activity against *S. epidermidis* (MIC 2 µg/mL)

and *S. aureus* (MIC 4 µg/mL). Compound 3e inhibited the growth of *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* at 4 µg/mL; while *S. aureus*, *B. pumilus*, and *S. typhi* were inhibited at 4 µg/mL. The last compound of this series, that is, 3g inhibited the growth of all the organisms, except for *B. pumilus* at MICs 4 and 8 µg/mL.

A careful analysis of MIC data shows some interesting trends. Comparison of the MIC data of 1-(benzothiazol-2'-yl)-5-amino-3*H*/methyl-4-phenylpyrazoles 3a–d and 3h–k revealed that replacement of pyrazole proton with a methyl group, in general, reduces the antibacterial activity. The most striking example in this series is that of 3d and 3k. While the compound 3d exhibits significant level of antibacterial activity against 3a, 3e, 3f, and 3a, compound 3k is completely inactive toward all the microorganisms.

Moreover, incorporation of fluorine at position 6 of benzothiazolyl also results in the complete loss of antibacterial activity as in 3b and 3i. On the other hand, in 1-(quinolin-2'-yl)-5-amino-3*H*/methyl-4-phenylpyrazoles 3e and 3l and 1-(4',6'-dimethylpyrimidin-2'-yl)-5-amino-3*H*/methyl-4-phenylpyrazoles 3g and 3n the antibacterial activity increases to a significant extent when the pyrazole proton is replaced by the methyl group toward certain microorganisms. It was also observed that when 2-quinoline nucleus is replaced by 4-quinoline at position 1 of the pyrazole, there is complete loss of antibacterial activity (3e vs 3f and 3l vs 3m).

4. Conclusion

Using easily obtainable compounds 2 and 1 we have prepared a new series of 1-heteroaryl-5-amino-3*H*/methylpyrazoles regioselectively. Many of these compounds 3a, 3d, 3e, 3g, 3l, and 3n showed excellent activity as displayed in Table 2 and Fig. 1. The antibacterial activity of these compounds was also compared with those of two commercial antibiotics namely Linezolid and Cef-Axetil.

5. Experimental

Melting points were determined in open capillaries with an electrical apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Buss Scientific IR M500 instrument. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker instrument at 300 MHz and 75 MHz, respectively. High resolution mass spectra (HRMS) were measured in EI mode on a Kratos MS-50 spectrometer.

Heteroarylhydrazines¹⁸ 1a–g were synthesized according to the literature procedures.

5.1. 1-Heteroaryl-5-amino-3*H*/methyl-4-phenylpyrazoles (3a–n)

General procedure: α-phenylacetylacetonitrile (2a–h, 0.01 mol) was dissolved in ethanol (25 mL) and an equimolar amount of appropriate heteroarylhydrazine (1a–h, 0.01 mol) was added to it. The reaction mixture was refluxed for 1 h. Excess of the solvent was removed by distillation. The crude products so obtained on cooling were recrystallized from ethanol.

The physical, analytical, and spectral data of synthesized compounds are given below:

5.1.1. 1-(Benzothiazol-2'-yl)-5-amino-4-phenylpyrazole (3a). Yield 78%; mp 220–22 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 3298, 3410 (NH₂ str.); ¹H NMR (CDCl₃ + DMSO-*d*₆) δ: 6.18 (br s, 2H, NH₂), 7.24–7.49 (m, 7H, 5', 6' Bz-H, Ph-H), 7.70 (s, 1H, 3-H), 7.83–7.87 (m, 2H, 4', 7' Bz-H); MS: *m/z* M⁺ 292. Anal. Calcd for C₁₆H₁₂N₄S; N, 19.18%. Found: 18.84%.

5.1.2. 1-(6'-Fluorobenzothiazol-2'-yl)-5-amino-4-phenylpyrazole (3b). Yield 80%; mp 265 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 3300, 3412 (NH₂ str.); ¹H NMR (CDCl₃ + DMSO-*d*₆) δ: 6.70 (br s, 2H, NH₂), 7.17–7.52 (m, 6H, 5'-H, Ph-H), 7.60 (dd, 1H, 7'-H, *J*_{o(H,7')} = 8.1 Hz, *J*_m = 2.4 Hz), 7.69 (s, 1H, 3-H), 7.82 (dd, 1H, 4'-H, *J*_o = 9.0 Hz, *J*_{m(H,7')} = 4.7 Hz); MS: *m/z* M⁺ 310. Anal. Calcd for C₁₆H₁₁FN₄S; N, 18.06%. Found: 17.92%.

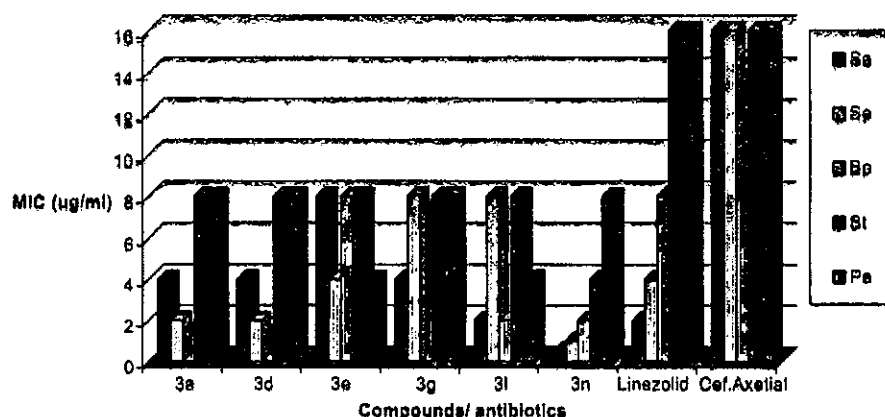


Figure 1. Comparison of minimum inhibitory concentration (MIC) of some compounds and standard antibiotics against test microorganisms.

5.1.3. 1-(6'-Chlorobenzothiazol-2'-yl)-5-amino-4-phenylpyrazole (3c). Yield 77%; mp 270–271 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3298, 3408 (NH_2 str.); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 6.54 (br s, 2H, NH_2), 7.45–7.56 (m, 6H, 5'-H, Ph-H), 7.92 (d, 1H, 4'-H, $J_o = 7.8$ Hz), 7.94 (s, 1H, 3-H), 8.08 (s, 1H, 7'-H); MS: m/z 326 (M^+) and 328 ($\text{M}^+ + 2$) in the ratio of 3:1 showing the typical isotopic profile. The exact mass measurement of the two isotopes was $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{S}$ requiring 326.0393 (Found: 326.0406) and 328.0381 (Found: 328.0366), respectively, in the ratio 3:1. Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{S}$: N, 17.18%. Found: 16.87%.

5.1.4. 1-(6'-Methylbenzothiazol-2'-yl)-5-amino-4-phenylpyrazole (3d). Yield 81%; mp 238–239 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3291, 3405 (NH_2 str.); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 2.48 (s, 3H, 6'- CH_3), 6.45 (br s, 2H, NH_2), 7.25 (d, 1H, 5'-H, $J_o = 8.7$ Hz), 7.43–7.47 (m, 5H, Ph-H), 7.64 (s, 1H, 7'-H), 7.68 (s, 1H, 3-H), 7.73 (d, 1H, 4'-H, $J_o = 8.6$ Hz); MS: m/z M^+ 306. Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}$: N, 18.30%. Found: 18.22%.

5.1.5. 1-(4'-Methylquinolin-2'-yl)-5-amino-4-phenylpyrazole (3e). Yield 78%; mp 148 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3276, 3311 (NH_2 str.); ^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.76 (s, 3H, 4'- CH_3), 6.62 (br s, 2H, NH_2), 7.22–7.55 (m, 5H, Ph-H), 7.67–7.72 (m, 2H, 6', 7'-H), 7.70 (s, 1H, 3-H), 7.92 (dd, 1H, 5'-H, $J_o = 8.4$ Hz, $J_m = 1.2$ Hz), 7.99 (dd, 1H, 8'-H, $J_o = 8.4$ Hz, $J_m = 1.2$ Hz), 8.11 (s, 1H, 3'-H); MS: m/z M^+ $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4$ requires 300.1372 (Found: 300.1374). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4$: N, 18.67%. Found: 18.61%.

5.1.6. 1-(7'-Chloroquinolin-4'-yl)-5-amino-4-phenylpyrazole (3f). Yield 76%; mp 182–183 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3287, 3405 (NH_2 str.); ^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.60 (br s, 2H, NH_2), 7.23–7.56 (m, 7H, 3', 6', Ph-H), 7.78 (s, 1H, 3-H), 8.02 (d, 1H, 2'-H, $J_o = 8.7$ Hz), 8.10 (d, 1H, 8'-H, $J_m = 2.1$ Hz), 8.96 (d, 1H, 5'-H, $J = 4.9$ Hz); MS: m/z M^+ 320. Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$: N, 17.50%. Found: 17.12%.

5.1.7. 1-(4',6'-Dimethylpyrimidin-2'-yl)-5-amino-4-phenylpyrazole (3g). Yield 74%; mp 182 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3288, 3468 (NH_2 str.); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 2.48 (s, 6H, 4', 6'- CH_3), 6.18 (br s, 2H, NH_2), 6.81 (s, 1H, 5'-H), 7.31–7.43 (m, 5H, Ph-H), 7.66 (s, 1H, 3-H); MS: m/z M^+ $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5$ requires 265.1327 (Found: 265.1330). Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5$: N, 26.41%. Found: 26.04%.

5.1.8. 1-(Benzothiazol-2'-yl)-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazole (3h). Yield 81%; mp 182–183 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3283, 3410 (NH_2 str.); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 2.26 (s, 3H, 3- CH_3), 6.28 (br s, 2H, NH_2), 7.26–7.29 (m, 9H, Ph-H, Bz-H); MS: m/z M^+ 306. Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}$: N, 18.30%. Found: 17.82%.

5.1.9. 1-(6'-Fluorobenzothiazol-2'-yl)-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazole (3i). Yield 78%; mp 195–197 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3283, 3399 (NH_2 str.); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 2.22 (s, 3H, 3- CH_3), 6.41 (br s,

2H, NH_2), 7.18–7.45 (m, 6H, 5', Ph-H), 7.59 (dd, 1H, 7'-H, $J_o(\text{H-F}) = 8.2$ Hz, $J_m(\text{H-H}) = 2.5$ Hz), 7.74 (dd, 1H, 4'-H, $J_o = 8.8$ Hz, $J_m(\text{H-F}) = 4.5$ Hz); MS: m/z M^+ 324. Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{S}$: N, 17.38%. Found: 16.94%.

5.1.10. 1-(6'-Chlorobenzothiazol-2'-yl)-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazole (3j). Yield 76%; mp 206 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3330, 3471 (NH_2 str.); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 2.22 (s, 3H, 3- CH_3), 5.83 (br s, 2H, NH_2), 7.18–7.40 (m, 6H, 5', Ph-H), 7.65 (d, 1H, 4'-H, $J_o = 8.7$ Hz), 7.71 (d, 1H, 7'-H, $J_m = 2.1$ Hz); MS: m/z M^+ 340. Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{S}$: N, 16.47%. Found: 16.06%.

5.1.11. 1-(6'-Methylbenzothiazol-2'-yl)-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazole (3k). Yield 72%; mp 178–179 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3223, 3334 (NH_2 str.); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 2.25 (s, 3H, 3- CH_3), 2.45 (s, 3H, 6'- CH_3), 6.45 (br s, 2H, NH_2), 7.23–7.46 (m, 6H, 5', Ph-H), 7.63 (s, 1H, 7'-H), 7.67 (d, 1H, 4'-H, $J_o = 8.4$ Hz); MS: m/z M^+ 320. Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$: N, 17.50%. Found: 17.11%.

5.1.12. 1-(4'-Methylquinolin-2'-yl)-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazole (3l). Yield 82%; mp 100 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3280, 3376 (NH_2 str.); ^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.34 (s, 3H, 3- CH_3), 2.74 (s, 3H, 4'- CH_3), 6.42 (br s, 2H, NH_2), 7.25–7.50 (m, 6H, 6', Ph-H), 7.66–7.71 (m, 1H, 7'-H), 7.88 (dd, 1H, 5'-H, $J_o = 8.4$ Hz, $J_m = 1.1$ Hz), 7.94 (dd, 1H, 8'-H, $J_o = 8.4$ Hz, $J_m = 1.2$ Hz), 8.075 (s, 1H, 3'-H); MS: m/z M^+ 314. Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4$: N, 17.83%. Found: 17.65%.

5.1.13. 1-(7'-Chloroquinolin-4'-yl)-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazole (3m). Yield 76%; mp 156–157 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3281, 3403 (NH_2 str.); ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 2.36 (s, 3H, 3- CH_3), 3.91 (br s, 2H, NH_2), 7.29–7.58 (m, 7H, 3', 6', Ph-H), 8.07 (d, 1H, 2'-H, $J_o = 8.7$ Hz), 8.14 (d, 1H, 8'-H, $J_m = 2.1$ Hz), 8.96 (d, 1H, 5'-H, $J_o = 4.5$ Hz); MS: m/z M^+ 334. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClN}_4$: N, 16.77%. Found: 16.45%.

5.1.14. 1-(4',6'-Dimethylpyrimidin-2'-yl)-5-amino-3-methyl-4-phenylpyrazole (3n). Yield 75%; mp 146–148 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3308, 3474 (NH_2 str.); ^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.33 (s, 3H, 3- CH_3), 2.59 (s, 6H, 4', 6'- CH_3), 6.08 (br s, 2H, NH_2), 6.83 (s, 1H, 5'-H), 7.25–7.45 (m, 5H, Ph-H); MS: m/z M^+ 279. Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5$: N, 25.09%. Found: 24.92%.

6. In vitro biological assay

6.1. Medium

Two solid media, namely Muller–Hinton Agar (MHA; Beef infusion 300 g/L, casein acid hydrolysate 17.5 g/L, starch 1.5 g/L, agar-agar 17 g/L, and distilled water 1000 mL, adjusted to pH 7.4) and soyabean casein digest agar (SCDA; casein enzymatic hydrolysate 17.0 g/L, papain digest of soyabean 3.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, dipotassium phosphate 2.5 g/L, dextrose 2.5 g/L, and

distilled water 1000 mL, adjusted to pH 7.3), were used for the biological assays.

6.2. Test microorganisms

Three Gram-positive bacteria *S. aureus* (MTCC 3160), *S. epidermidis* (MTCC 2639), and *B. pumilus* (MTEC 1456), and two Gram-negative bacteria *S. typhi* (MTCC 733) and *P. aeruginosa* (MTCC 3541) were used for the biological assays.

6.3. Primary screening

Primary screening of fourteen compounds 3a–n was done by the agar diffusion assay technique by following the method of Kumar et al.^{1b} 24-h-old bacterial cultures of all test microorganisms were used as inoculum, which was adjusted to 0.5 McFarland Standard, that is, 1.5×10^8 CFU/mL.¹⁹ The stock solutions of all the test compounds (1 mg/mL) were prepared by dissolving 1 mg of the test compound in ethanol (1 mL). Linezolid, Cefroxime axetil, and ethanol were used as positive and negative controls, respectively.

20 mL of molten and cooled MHA and 500 μ L of each test bacterial culture were mixed (separate flasks were used for each bacterial culture) and poured in sterilized and labelled petri plates. The wells of 6 mm were punched in the solidified petri plates, aseptically. Fifty microliters from stock solutions of all the compounds as well as controls was added to each well of labelled petri plates and incubated at 35 °C for 24 h. The diameter of the zone of growth inhibition around each well was measured after incubation using a Vernier Caliper.

6.4. Minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of the antimicrobial agent that prevents the development of visible growth after overnight incubation.²⁰ MIC of compounds against Gram-positive and Gram-negative test bacteria was determined by the method of NCCLS.²¹ All the test cultures were streaked on SCDA and incubated overnight at 37 °C. Turbidity of all the bacterial cultures was adjusted to 0.5 McFarland Standard by preparing bacterial suspension of 3–5-well isolated colonies of the same morphological type selected from an agar plate culture. The cultures were further diluted 10-fold to get an inoculum size of 1.2×10^7 CFU/mL. Stock solution of 4 mg/mL of each compound was prepared in ethanol and was appropriately diluted to get a final concentration of 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, and 0.12 mg/mL.

Standard antibiotics (Linezolid, Manufacturer-Unichem Lab. Ltd., Batch No. N1933005; Cefroxime axetil, Manufacturer-Glaxo, Batch No. HD-313) were also diluted in the same manner. Three hundred and twenty microliters of each dilution was added to 20 mL molten and cooled MHA (separate flasks were taken for each dilution). After thorough mixing, the medium was poured in sterilized petri plates. The test bacterial cultures were spotted in a predefined pattern by aseptically

transferring 5 mL of each bacterial culture on the surface of solidified agar plates and incubated at 35 °C for 24 h.

Acknowledgments

We are grateful to the UGC, New Delhi, India, for financial assistance. High Resolution mass spectra were provided by the UCSF (USA) Mass spectrometry Facility (A. L. Burlingame, Director) supported by the NIH NCRR BRTP RR01614. Thanks are also due to R&IC, Lucknow, India, for providing elemental analysis.

References and notes

- (a) Kane, J. L.; Hirth, B. H.; Laing, O.; Gourlie, B. B.; Nahill, S.; Barsomian, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 4463; (b) Kumar, V.; Aggarwal, R.; Tyagi, P.; Singh, S. P. *Eur. J. Med. Chem.* 2005, 40, 922.
- Singh, S. P.; Prakash, O.; Tomer, R. K.; Sawhney, S. N. *Indian J. Chem.* 1978, 16B, 733.
- (a) Kudo, N.; Furuta, S.; Taniguchi, M.; Iida, T.; Sato, K. *Chem. Pharm. Bull.* 1999, 47, 857; (b) Jung, J. C.; Walkins, B. B.; Avery, M. A. *Tetrahedron* 2003, 59, 3039.
- (a) Davies, L. P.; Chow, S. C.; Skerrett, J. H.; Brown, D. J.; Johnston, G. A. R. *Life Sci.* 1984, 34, 2117; (b) Davies, L. P.; Brown, D. J.; Chow, S. C.; Johnston, G. A. R. *Neurosci. Lett.* 1983, 28, 1071.
- (a) Skipper, H. E.; Robins, R. K.; Thompson, J. R. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1955, 89, 594; (b) Hsu, T. C.; Robins, R. K.; Cheng, C. C. *Science* 1956, 123, 848.
- (a) Roland, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1956, 78, 784; (b) Cheng, C. C.; Roland, R. K. *J. Org. Chem.* 1956, 21, 1240.
- Davoll, J.; Kerridge, K. A. *J. Chem. Soc.* 1961, 2589.
- Duma, J.; Hatoum-Mekdad, H.; Sibley, R.; Riedl, B.; Scott, W. J.; Monahan, M. K.; Lowinger, T. B.; Brennan, C.; Natero, R.; Turner, T.; Johnson, J. S.; Schoenlebar, R.; Bhargava, A.; Wilhelm, S. M.; Housley, T. J.; Ranges, G. E.; Shrikhande, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 2051.
- Regan, J. R.; Cirillo, P. F.; Hickey, E. R.; Moss, N.; Cywin, C. L.; Pargellis, C.; Gilmore, T. A. PCT Int. Appl. WO 9923091, 1999; *Chem. Abstr.* 1999, 130, 325145.
- Creswell, M. W.; White, A. D. U.S. Patent 5,162,360, 1993; *Chem. Abstr.* 1993, 118, 147556.
- (a) Kumar, D.; Singh, S. P. *Heterocycles* 2004, 63, 145. A review; (b) Singh, S. P.; Kumar, D.; Kumar, D.; Martinez, A.; Elguero, J. *J. Het. Chem.* 1996, 33, 323; (c) Singh, S. P.; Kumar, D.; Kapoor, J. K. *J. Chem. Research (S)* 1993, 9, 163.
- Blatt, A. H. In *Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, New York, Inc. London: Chapman and Hall, Limited; 1959; Coll. Vol. 2, pp 487–489.
- Singh, S. P.; Sehgal, S.; Tarar, L. S. *Indian J. Chem.* 1989, 27B, 27.
- Singh, S. P.; Kumar, D.; Savita *Indian J. Chem.* 1993, 31B, 262.
- (a) Gonzalez, E.; Faure, R.; Vincent, E. J.; Espada, M.; Elguero, J. *Org. Magn. Reson.* 1979, 12, 587; (b) Frigola, J.; Colombo, A.; Parca, J.; Martinez, L.; Sagarra, R.; Roser, R. *J. Med. Chem.* 1989, 24, 435.
- Singh, S. P.; Tarar, L. S.; Vaid, R. K.; Elguero, J.; Martinez, A. *J. Heterocycl. Chem.* 1989, 26, 733.

17. Frigola, J.; Colombo, A.; Pares, J.; Martinez, L.; Sagarra, R.; Roser, R. *Eur. J. Med. Chem.* 1989, 24, 435.
18. (a) Potts, K. T.; Battacharya, J.; Smith, L. S.; Ihrig, A. M.; Girad, C. A. *J. Org. Chem.* 1972, 37, 4410; (b) Katz, L. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 4007; (c) Kosolapoff, G. M.; Roy, C. H. *J. Org. Chem.* 1961, 26, 1895; (d) Rao, V. R.; Srinivasn, V. R. *Experientia* 1964, 20, 200; (e) Mehrotra, S.; Bartwal, J. P.; Pandey, B. R.; Bhargava, K. P.; Parmar, S. S. *J. Het. Chem.* 1980, 17, 213; (f) Khan, M. A.; Ferrerriaga, R. *J. Het. Chem.* 1978, 15, 913.
19. McFarland, J. *J. Am. Med. Assoc.* 1907, 14, 1176–1178.
20. Greenwood, D.; Slack, R.; Peutherer, J. *Med. Microbiol.* In: ELST Publishers—A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control, 15th ed.; 1997.
21. NCCLS, Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, Approved Standards, 5th ed.; M7-A5, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, 2000.