

Clarke, Modet & Co.

COLOMBIA

E-MAIL: [clarkemodet@clarkemodet.com.co](mailto:clarkemodet@clarkemodet.com.co)  
SANTAFÉ DE BOGOTÁ, A.A. 92397

283 768  
X

SEÑORES  
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO  
Radicación : 00097184 00000004 Folios: 187  
Fecha (FOLIO): 2001-07-27 11:01:32  
Tramite : 002 PATENTES D : REGISTRO/ 444 RESPUESTA  
Dependencia: 8026 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

COD:08

REF: EXPEDIENTE N°. 00097184 ✓  
FECHA DE LA SOLICITUD: DIC. 21, 2000  
SOLICITANTE: SUGEN, INC.  
TITULO: 7-AZA-INDOLIN.2.ONAS SUSTITUIDAS EN 4 Y SU USO  
COMO INHIBIDORES DE PROTEINA QUINASA

**ASUNTO: CONTESTACIÓN REQUERIMIENTO**

DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante, por el presente escrito doy respuesta a su Auto notificado por estado de 29 de Marzo de 2.001 que vence Mayo 29 de 2.001, del cual solicité una prórroga y me permito presentar los siguientes documentos:

- Nuevo capítulo descriptivo y reivindicatorio legibles.
- Documento de Poder y la prueba de existencia y representación legal de la sociedad solicitante, junto con su traducción, debidamente legalizados.
- El lugar de constitución de la sociedad solicitante es el Estado de Delaware, Estados Unidos de América.
- Documento de cesión del derecho a la patente otorgado por los inventores al solicitante, debidamente legalizado.
- La copia certificada de la prioridad fue presentada el 20 de Marzo de 2.001, estando dentro del término de 3 meses que exige el Convenio de Paris.

En el evento que resultara alguna discrepancia de carácter técnico, manifiesto expresamente que el solicitante mantiene interés en la solicitud por lo que quedo a disposición de atender a las observaciones formales y técnicas que su Despacho requiera antes o durante el examen de fondo, evitando el archivo de la solicitud.

Ya que la solicitud cumple con todos los requisitos, atentamente solicito se disponga por quien corresponda la publicación de la solicitud en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Señor Jefe,

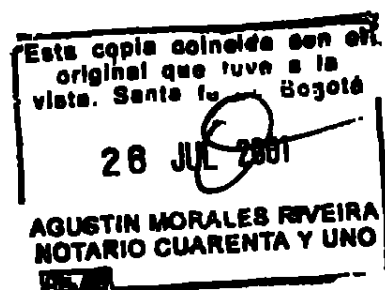
DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN  
LCD/srr  
P- 396

204  
204  
7

TRANSLACION OFICIAL 15  
JUAN PABLO PIEDRAHITA ACOSTA  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
C. IDONEIDAD 045  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**CONDADO DE SAN MATEO } S.S.**

1



285  
3

DA FE mi firma y sello oficial.

Firma: (Firmado) Debra K. Bowen

Firma del Notario Público,

(Sello a Tinta: Debra K. Bowen, Comisión # 1233154, NOTARIO PÚBLICO - CALIFORNIA, CONDADO DE SAN MATEO, Mi Comisión expira Agosto 27, 2003).

### OPCIONAL

*Aunque la información a continuación no se requiere por ley, puede ser valiosa para quienes se basen en el documento y podrían evitar que fraudulentamente se desprendan y se vuelvan a adjuntar otros documentos a este formulario.*

#### Descripción del Documento Adjunto

Título o Tipo de Documento: Poder – Colombia-

Fecha del Documento: Diciembre 6, 2000 Número de Páginas 1 PG

Firmante(s) distintos a los arriba mencionados: (en blanco)

#### Facultad(es) Reivindicadas por el Firmante

Nombre del Firmante: Dorian Rinella

☐ en blanco

INDIVIDUO

☒ X

FUNCIONARIO CORPORATIVO-CARGO(S): Vicepresidente Principal de Operaciones

☐ en blanco

SOCIO-

☐ en blanco

NÚMERO DE PÁGINAS

☐ en blanco

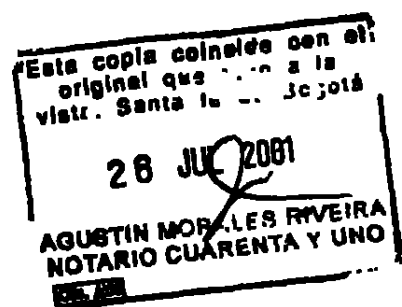
LIMITADA

☐ en blanco

APODERADO

☐ en blanco

SÍNDICO



UNION OFICIAL DE  
JUAN PABLO PIEDRAHITA ACOSTA  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
C. IDONEIDAD 045  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

286  
A

en blanco

CUSTODIO

en blanco

OTRO: \_\_\_\_\_ (en blanco)

EL FIRMANTE REPRESENTA:

Sugen Inc.

HUELLA DIGITAL DEL

PULGAR DERECHO

DEL FIRMANTE

(en blanco)

1997 Asociación Nacional de Notarios 9350 De Soto Ave, P.O. Box 2402,  
Chatsworth, CA 91313-2402 Prod. No. 5907 Pedido: Llamar a Línea Gratuita 1-  
800-876-6827.

ESTADO DE CALIFORNIA

(Sello Pre-Impreso)

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

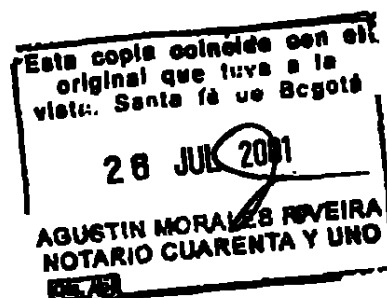
2. Ha sido firmado por DEBRA K. BOWEN

3. Actuando en calidad de Notario Público, Estado de California

4. Lleva el sello/estampilla de DEBRA K. BOWEN, Notario Público, Estado de California

CERTIFICADO

3



ON OFICIAL No. 00111111  
JUAN PEDRAHITA, C. BOWEN  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
C. IDONEIDAD 045  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

5. En Sacramento California
6. El 24 de Abril, 2001
7. Por el Sub-Secretario de Estado, Estado de California
8. No. 96153
9. Sello/Estampilla

(Sello de Oblea del Estado de California, Sello a tinta del Secretario de Estado)

10. Firma (Firmado)

Bill Jones

Secretario de Estado

Por (Firmado) Ilegible

NP-24 A (Rev 1-96)

287  
g 292

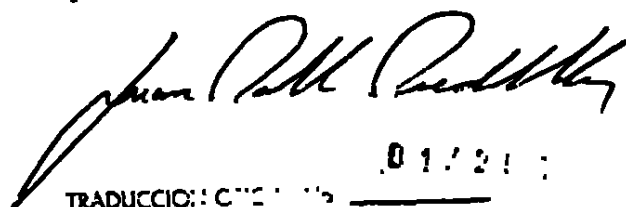
MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES  
CUTY FIRMAS APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPLEA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO  
2001 JUL 25 P 12:34  
JEFE DE LEGALIZACION  
SABIA DE BOGOTA D.C.

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos  
de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, Julio 24, 2001.

01/211

  
 TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA  
 JUAN PABLO ESCOBAR AGUILERA  
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
 C. IDONEIDAD 045  
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Esta copia coincide con el  
original que tuve a la  
vista. Santa Fe de Bogotá  
28 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

CLARKE, MODET & C<sup>o</sup> - COLOMBIAPROPIEDAD INDUSTRIAL Y  
DERECHOS DE AUTOR

## PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

Dorian Rinella,

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

Sugen, Inc.

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

Estado de Delaware

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en 230 East Grand Avenue South San Francisco, CA 94080-4811

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Santa Fé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistír, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistír a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

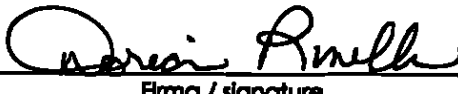
a los

días de

de

on this 6th day of

December 2000

  
Firma / signature  
Dorian Rinella, Senior Vice President  
Operations

## POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Dorian Rinella,

legal representative(s) of  
SUGEN, INC.an organization existing under the laws of  
the state of Delaware, USA

and in present execution of its business activity, domiciled at  
230 East Grand Avenue  
South San Francisco, California 94080-4811

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, Identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, Identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Santa Fé de Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:  
"Formulations for Pharmaceutical Agents Ionizable as Free Acids or Free Bases"

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, vegetal varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at So. San Francisco, CA - USA

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa Fé de Bogotá  
28 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES ROVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

289  
ZSA

-C LOMBIA-

**CERTIFICAD NOTARIAL (Cuando el solicitante es SOCIEDAD)**

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. \_\_\_\_\_ (nombre de la persona que firma el poder) mayor de edad y domiciliado en \_\_\_\_\_ firmó de su puño y letra el documento que antecede.
2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.
3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de \_\_\_\_\_ de la persona jurídica \_\_\_\_\_
4. La citada persona jurídica con sede en \_\_\_\_\_ está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.
6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

\_\_\_\_\_  
Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

**CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)**

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. \_\_\_\_\_ (nombre de la persona que firma el poder) mayor de edad y domiciliado en \_\_\_\_\_ firmó en su presencia el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

\_\_\_\_\_  
Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Consul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acreditan tales circunstancias.

**NOTARIAL CERTIFICATE ( When the applicant is a CORPORATION)**

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_ the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. \_\_\_\_\_ (name of the person who signs the power of attorney) of legal age and domiciled in \_\_\_\_\_ set his hand on the foregoing document.
2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.
3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of \_\_\_\_\_ of the juridical person \_\_\_\_\_
4. The mentioned juridical person with place of business in \_\_\_\_\_ is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.
6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

\_\_\_\_\_  
Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

**NOTARIAL CERTIFICATE ( When the applicant is an INDIVIDUALS)**

On this \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_ the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. \_\_\_\_\_ (name of the person who signs the Power of Attorney) of legal age and domiciled at \_\_\_\_\_ signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

\_\_\_\_\_  
Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those circumstances were exhibited to him.

Esta copia coincide con los documentos originales que me fueron exhibidos a la vista. Santa Fe de Bogotá

26 JUL 2001

AGUSTIN MORALES RIVERA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

290  
245

# State of California

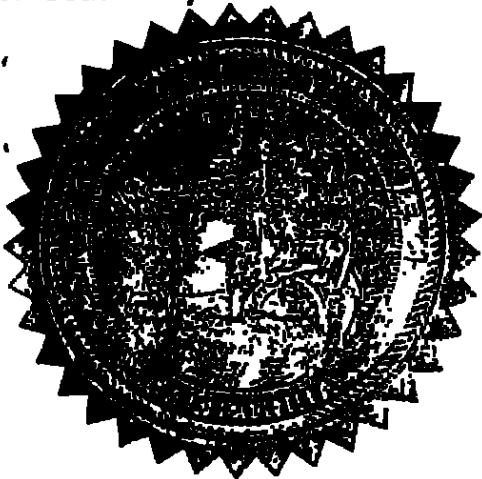
## SECRETARY OF STATE APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. **Country: United States of America**  
**This public document**
2. **has been signed by DEBRA K. BOWEN**
3. **acting in the capacity of Notary Public, State of California**
4. **bears the seal/stamp of DEBRA K. BOWEN, Notary Public,**  
**State of California**

### CERTIFIED

5. **At Sacramento, California**
6. **the 24th day of April 2001**
7. **by Deputy Secretary of State, State of California**
8. **No. 96153**
9. **Seal/Stamp:**



#### 10. Signature

*Bill Jones*  
BILL JONES  
Secretary of State

BY

*J. J. [Signature]*

TRANSLATION OFFICIAL No. 01 / 251

JUAN F. SANCHEZ AGUILERA

TRANSLATION OFFICIAL

SECRETARY OF STATE



Esta copia coincide con el  
original que tuve a la  
vista. Santa Fe de Bogotá  
26 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES RIVERA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

CALIF RNIA ALL-PURPOSE ACKN WLEDGMENT

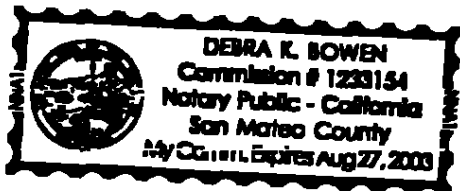
State of California

County of SAN MATEO } ss.

On DEC. 6, 2000, before me, DEBRA K. BOWEN, Notary Public  
personally appeared DORIAN RINELLA

☒ personally known to me  
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



Place Notary Seal Above

WITNESS my hand and official seal.

Debra K. Bowen  
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: POWER OF ATTORNEY - COLOMBIA

Document Date: DEC. 6, 2000 Number of Pages: 1 PG.

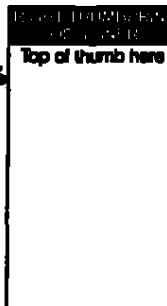
Signer(s) Other Than Named Above: \_\_\_\_\_

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: DORIAN RINELLA

- ☐ Individual  
☒ Corporate Officer — Title(s): SENIOR VICE PRESIDENT - OPERATIONS  
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General  
☐ Attorney In Fact  
☐ Trustee  
☐ Guardian or Conservator  
☐ Other: \_\_\_\_\_

Signer is Representing: SUGEN, Inc



Este copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa fe de Bogota  
26 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES RIVERA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

292  
297

61 / 252

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**230 East Grand Avenue**  
**South San Francisco, California 940080-4811**  
**Fecha 7/11/01**

1

293  
298

**RECONOCIMIENTO PARA TODOS LOS FINES**

**ESTADO DE CALIFORNIA**

**CONDADO DE SAN MATEO }**

En 7/11/01 , ante mi, Thom O'Brien, Notario Público, (Nombre y Cargo del Funcionario (p.ej. "Jane Doe, Notario Público"), compareció personalmente Gerald McMahon a quien conozco personalmente (o quien presentó pruebas basadas en evidencia suficiente) de ser la(s) persona(s) cuyo(s) nombre(s) está(n) suscrito(s) en el instrumento adjunto y reconoció (eron) ante mí que él(ellos) suscribió(eron) el mismo en su(s) calidad(es) de autorizado(s) y que por su(s) firma(s) sobre el instrumento la(s) persona(s) o la entidad a nombre de quien la(s) persona(s) actúa(n) suscribió(eron) el instrumento.

DA FE mi firma y sello oficial.

Firma: (Firmado)

Firma del Notario Público,

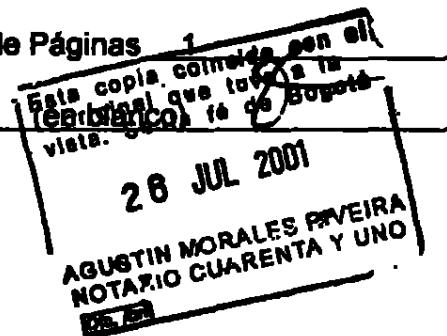
(Sello a Tinta: Debra K. Bowen, Comisión # 1238089, NOTARIO PÚBLICO - CALIFORNIA, Ciudad y Condado de San Mateo, Mi Comisión expira Noviembre 12, 2003).

**INFORMACIÓN OPCIONAL**

Título o Tipo de Documento: Declaración

Fecha del Documento: 7/11/01 Número de Páginas 1

Firmante(s) distintos a los arriba mencionados: \_\_\_\_\_



294  
-344

**Estado de California**

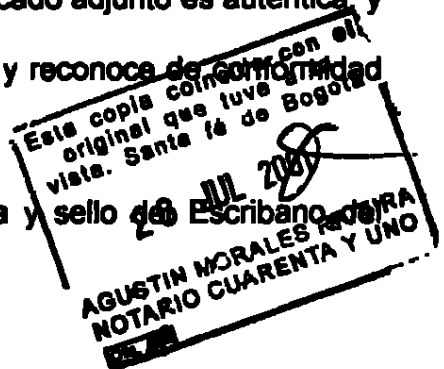
**Ciudad y Condado de San Francisco**

Yo, Ryan Brooks, Escribano en y para la Ciudad y el Condado de San Francisco, POR EL PRESENTE CERTIFICO que:

THOM O'BRIEN, cuyo nombre está suscrito en el Certificado de Reconocimiento, Prueba o Declaración Juramentada adjunto, era en el momento de tomar dicho Reconocimiento, Prueba o Declaración Juramentada, un NOTARIO PUBLICO en y para la Ciudad y el Condado de San Francisco, debidamente nombrado, comisionado y juramentado en dicha Ciudad y Condado, y como tal era un Funcionario de dicho Estado, debidamente autorizado por las leyes de dicho Estado para tomar los mismos, así como para tomar y certificar la evidencia y el reconocimiento de escrituras y otros instrumentos por escrito para ser registrados en dicho Estado, y que deben dársele plena fe y crédito a sus actos oficiales; que el certificado de dicho funcionario debe llevar un sello; que la impresión de su sello oficial no se requiere por ley que esté en el archivo de la Oficina del Escribano del Condado.

Además certifico que estoy bien familiarizado con la caligrafía de dicho Notario y verdaderamente creo que la firma en dicho el Certificado adjunto es auténtica, y además certifico el instrumento adjunto se suscribe y reconoce de conformidad con las leyes del Estado de California.

En Testimonio de lo Cual, he estampado my firma y sello de Escribano.



295  
300

Condado en y para la Ciudad de San Francisco.

Fecha: Julio 11, 2001.

(Firmado) Ryan Brooks

Escribano del Condado

(Sello a Tinta del Escribano del Condado)

14172

**ESTADO DE CALIFORNIA**

(Sello Pre-Impreso)

**SECRETARIO DE ESTADO**

**APOSTILLA**

(Convención de La Haya de Octubre 5 1961)

1. ***País: Estados Unidos de América***

***Este documento público***

2. ***Ha sido firmado por RYAN BROOKS***

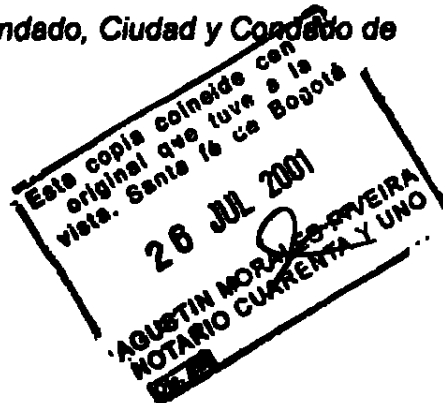
3. ***Actuando en calidad de Escribano de Condado, Ciudad y Condado de San Francisco, Estado de California***

4. ***Lleve el sello/estampilla del Escribano de Condado, Ciudad y Condado de San Francisco, Estado de California***

**CERTIFICADO**

5. ***En San Francisco, California***

6. ***El 11 de Julio, 2001***



7. Por el Sub-Secretario de Estado, Estado de California

8. No. 36661

9. Sello/Estampilla

(Sello de Oblea del Estado de California, Sello a tinta del Secretario de Estado)

10. Firma (Firmado)

Bill Jones

Secretario de Estado

Por (Firmado) Ilegible

NP-24 A (Rev 1-96)

osp 99 21639

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos  
de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, Julio 24, 2001.

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL  
2001 JUL 25 P 12  
JUL 25  
JUL 25  
JUL 25

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

15 Jul - 8  
Juan P. Pedraza  
CUT. RHA APARECE EL  
DE MEXICO CEEPT  
LAS UNIONES INDIVIDUALES

Juan P. Pedraza

Esta copia coincide con el  
original que tuve a la  
vista. Santa Fe de Bogotá.  
26 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

P 302

## DECLARATION

**1, Gerald McMahon, Senior Vice President, Discovery, and legal representative of SUGEN, INC., an organization existing under the laws of the state of Delaware, USA, and incorporated on July 13, 1991, and domiciled at 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080-4811**

**Do hereby certify that Dorian Rinella, Senior Vice President, Operations, is an authorized officer of SUGEN, INC. and has authority to sign on behalf of SUGEN, INC.**

**By:**

By: Kenneth E. Baker

**Gerald McMahon, Senior Vice President, Discovery  
Sugen, Inc.  
230 East Grand Avenue  
South San Francisco, California 94080-4811**

**Date:**

Date: 7/11/01

PRODUCCION OFICIAL  
 PABLO PIERRE  
 1945  
 NACIONAL DE COLOMBIA

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa Fé de Bogotá

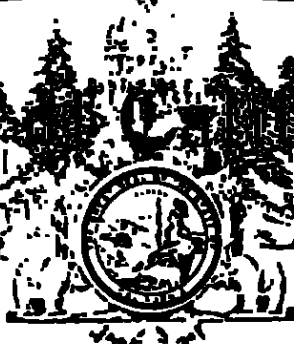
26 JUL 2002

AGUSTIN MORALES RIVERA  
NOTA 0. CUARENTA Y UNO

DE 40

298  
363

State of California



SECRETARY OF STATE  
**APOSTILLE**

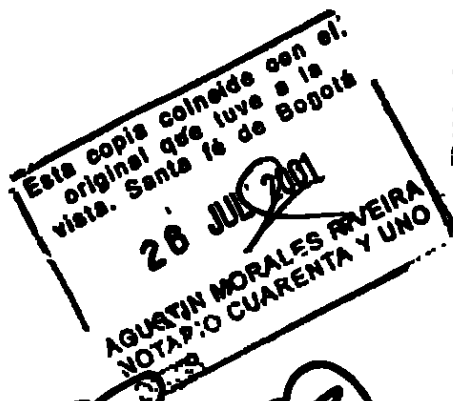
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America  
This public document
2. has been signed by RYAN BROOKS
3. acting in the capacity of COUNTY CLERK, City and County of San Francisco, State of California
4. bears the seal/stamp of the City and County of San Francisco, State of California

**CERTIFIED**

5. At San Francisco, California
6. The 11TH day of JULY, 2001
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 36661
9. Seal/Stamp:

10. Signature



*Bill Jones*  
BILL JONES  
Secretary of State

BY *Cecilia J. Johnson*

01/252

JULIA

TRANU  
JUAN PABLO



299  
309

State of California  
City and County of San Francisco



14172

I, Ryan Brooks, County Clerk in and for the City and County of San Francisco,  
DO HEREBY CERTIFY: That

THOM O'BRIEN

whose name is subscribed to the attached certificate of acknowledgment, proof or affidavit, was at the time of making said acknowledgment, proof or affidavit, a Notary Public in and for the City and County of San Francisco, duly commissioned and sworn in said City and County, and was as such, an officer of said State, duly authorized by the laws thereof to take and certify the same, as well as to take and certify the proof and acknowledgment of deeds and other instruments in writing to be recorded in said State, and that full faith and credit are and ought to be given to his or her official acts; that the certificate of such officer is required to be under seal; that the impression of his or her official seal is not required by law to be on file in the office of the County Clerk. I further certify that I am well acquainted with the handwriting of said notary and verily believe that the signature to the attached certificate is genuine, and further that the annexed instrument is executed and acknowledged according to the laws of the State of California.

In witness whereof, I have hereunto set my hand and assumed the seal of the County Clerk, in and for the City and County of San Francisco.

Date:

JUL 11 2001

Ryan Brooks  
County Clerk

NOTION OFFICIAL No. 011252

310 PIEDRAHITA AGUILERA

137 E INDEPENDENT OFFICIAL

137 E INDEPENDENT OFFICIAL

1111 LUNAL DE COLOMBIA



Esta copia coincide con el  
original que tuvo a la  
vista. Santa Fé de Bogotá  
26 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES RIVERA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

CALIFORNIA



ALL-PURPOSE



ACKNOWLEDGEMENT

STATE OF CALIFORNIA )

COUNTY OF SAN MATEO )

On 7/11/01 before me, THOM O'BRIEN NOTARY PUBLIC,  
DATE NAME, TITLE OF OFFICER - E.G., "JANE DOE, NOTARY PUBLIC"

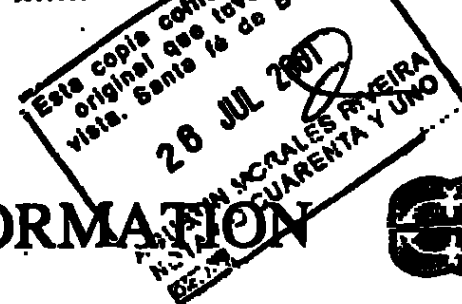
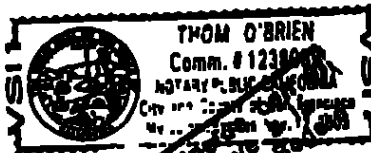
personally appeared, ESCALA, D W & MAITON

personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

[Signature]  
NOTARY PUBLIC SIGNATURE

(SEAL)



OPTIONAL INFORMATION



TITLE OR TYPE OF DOCUMENT DECLARATION

DATE OF DOCUMENT 7/11/01 NUMBER OF PAGES 1

SIGNER(S) OTHER THAN NAMED ABOVE ⊖

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 01/ 241 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Juan Pablo Piedrahita Aguilera, Traductor e Intérprete Oficial debidamente reconocido de conformidad con el Certificado de Idoneidad Profesional No. 0045 expedido por la Universidad Nacional de Colombia.

Se traduce un Certificado de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, la Carátula de Recordación, el documento de Cesión a favor de la compañía SUGEN INC., adjunto al certificado de Apostilla No. 01021946-1 de Julio 9, 2001, todo escrito en inglés.

**ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

**A TODOS A QUIENES ESTOS PRESENTES LLEGAREN:**

**DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS**

**OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS**

**Junio 29, 2001**

**POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE ADJUNTA SE ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO REGIASTRADO EN MARZO 16, 2000.**

Por autoridad del  
COMISARIO DE PATENTES Y MARCAS  
(FIRMADO) N. WILLIAMS

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa fe de Bogotá  
9 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

RECEIVED  
AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO  
CALLE 100 No. 100-100  
BOGOTA, D.C. COLOMBIA

302  
307

Funcionario que Certifica

(SELLO DE OBLEA DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS  
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA)

(Sello Redondo a Tinta, Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos,  
Marzo 16, 2000)

03/16/00

04-10-2000, Código de Barras, 101314380

No. de Expediente 7683-156-888

Al Honorable Comisario para Patentes y Marcas, Washington D.C. 20231

Favor registrar los documentos originales adjuntos o sus copias.

1. Nombre de la(s) parte(s) que traspasa(n):

Congxin LIANG; Li SUN; Chung Chen WEI; Peng Cho TANG; Gerald  
McMAHON; Klaus Peter HIRTH, y Jingron CUI

Se adjuntan nombres o partes que traspasan adicionales? Si  No ☒

2. Nombre y Dirección de la parte que recibe:

Nombre: Sugen Inc.

Dirección: 230 East Grand Avenue

South San Francisco, CA 94080-4811

País ( si es diferente a EE.UU.)

3. Clase de Traspaso

☒

Cesión

Fusión

Contrato de Seguridad

Otro

Esta Copia es un duplicado del original que tuve a la vista. Santa Fe de Bogotá

19 JUL 2001

AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

303  
308

Fecha de Suscripción:

Marzo 6, 2000

4. Solicitud No(s). ó No(s) de Patente:

Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de suscripción de la solicitud es : ( en blanco )

A. No(s). de Solicitud(es) de Patente(s) 60/171.288

B. No(s). de Solicitud(es) de Patente(s) ( en blanco )

Hay números adicionales adjuntos?

(en blanco)

Si

☒

No

5. Nombre y Dirección de la parte a quien se le debe dirigir la correspondencia concerniente al documento:

Nombre: PENNIE & EDMONDS LLP

Dirección: 1667 K. Street N.W.

Washington D.C. 20006

6. Número total de solicitudes de patentes involucradas: ....1

7. Total Derechos (37 CFR §3.41) \$40.00

Favor cargar a la cuenta de depósito listada en el No. 8.

8. Cuenta de Depósito Número 16-1150

NO USE ESTE ESPACIO (en blanco)

9. Declaración y Firma

*En mi leal saber y entender, la información anterior es verdadera y correcta y cualquier copia adjunta es una copia verdadera del documento original.*

Esta copia coincide con el  
original visto. Santa Fé de 30, 41, 8

19 JUL 2001

AGUSTIN MORALES RIVERA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

304  
309

Max Bachrach P-45,479 (Firmado) Marzo 16, 2000

Por: Laura A. Coruzzi

Nombre del Firmante (Reg. No. 30,742) Firma Fecha

Número Total de páginas, incluyendo la carátula, los anexos y documentos: 5

Los documentos enviado por correo deben registrarse con la información requerida de la carátula con el Comisario de Patentes y Marcas, Casilla Cesiones, Washington D.C. 20231

(Sello: 04/06/2000 TTDM11 00000168 161150 60171288

01 FC: 581 40.00 CH)

PATENTE

RIEL: 010658 MARCO: 0950

-----  
CESION

CONJUNTA

POR CUANTO, nosotros Congxin LIANG; ciudadano de la República Popular de China, con domicilio en 726 West Remington Drive, Sunny vale, CA 94087-2242; Li SUN ciudadano de la República Popular de China, con domicilio en 64 Rockharbor Lane, Foster City, CA 94404; Chung Chen WEI ciudadano de la los Estados Unidos con domicilio en 39 Commons Lane, Foster City, CA 94404; Peng Cho TANG ciudadano de la los Estados Unidos con domicilio en 827 Camino Ricardo, Moraga, CA 94556; Gerald McMAHON ciudadano de la los Estados Unidos con domicilio en 1800 Schultz Road, Menlo Park, CA 94025; Klaus Peter HIRTH ciudadano de la los Estados Unidos con domicilio en 334 Collingwood Street, San Francisco, CA 94114; Justin Morales SVEIRA ciudadano de la

Esta copia coincide con el original que tuve en la  
4-6 JUL 2001  
JUSTIN MORALES SVEIRA  
NOTARIO PUBLICO  
C.A. 94025

305  
310

República Popular de China, con domicilio en 653 Catamaran Street, #3, Foster City, CA 94404, los CEDENTES, son los inventores de la invención 7-AZA-INDOLIN-2-ONES COMO INHIBIDORES DE PROTEINA KINASA para la cual hemos suscrito una solicitud provisional de Patente en los Estados Unidos

☐ La cual se suscribió el ☐ la misma fecha que el presente o ☐

☒ se identifica por el expediente No. 7683-156-888 de Pennie & Edmond LLP

☒ se presentó el 21 de Diciembre, 1999, Solicitud No. 60/171,288

y POR CUANTO, Sugan, Inc., con domicilio comercial en 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080-4811, el CESIONARIO, desea adquirir la totalidad de los derechos propiedad y participación de la invención en y sobre dicha invención y dicha solicitud:

AHORA EN CONSECUENCIA, a cambio de una buena y valiosa contraprestación, recibo de la cual se reconoce por el presente, nosotros los CEDENTES hemos vendido, cedido, transferido y traspasado y por este presente vendemos, cedemos, transferimos y traspasamos a dicho CESIONARIO, sus sucesores, representantes legales y causahabientes, la totalidad de nuestros derechos, títulos y participación en y sobre dicha invención y sobre dicha solicitud provisional de los Estados Unidos y sobre todas las solicitudes que reivindiquen prioridad sobre ella bajo el Título 35 del Código de los Estados Unidos, Sección 119(e) y sobre cualquiera de las divisiones, renovaciones y continuaciones de ella, y de todos los Títulos de Patente de los Estados Unidos que puedan otorgarse sobre ella y todas las re-expediciones y

Esta copia coincide con el original que se encuentra en la vista. Santa Fe, N.M., 19 JUL 2001  
AGUSTIN I. ALVARADO  
NOTARIO CUANTRO PUEBLO  
N.M.

extensiones de ella; y todas las solicitudes de protección de propiedad industrial incluyendo sin limitación, todas las solicitudes de patentes, modelos de utilidad, diseños que puedan presentarse en adelante para dicha invención en cualquier país o países extranjeros a los Estados Unidos, junto con el derecho de presentar dichas solicitudes y los derechos de reivindicar prioridad para la misma derivados de dicha solicitud de los Estados Unidos bajo las Leyes de Patentes de los Estados Unidos, la Convención de Protección de Propiedad Industrial, o cualquier otro convenio internacional o cualesquiera leyes locales del país en el cual se presente cualquier solicitud, que puedan aplicársele; y todas las formas de protección de propiedad industrial, incluyendo sin limitación, patentes, modelos de utilidad, certificados de inventores, y diseños que puedan otorgarse para dicha invención en cualquier país o países extranjeros a los Estados Unidos y todas las extensiones, renovaciones y re-expediciones de ella;

Y NOSOTROS POR EL PRESENTE autorizamos y solicitamos al Comisario de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, y a cualquier funcionario de cualquier país o países extranjeros a los Estados Unidos, cuya función sea otorgar patentes u otras evidencia o formas de protección industrial sobre solicitudes como se ha mencionado, para expedir la misma a dicho CESIONARIO, sus sucesores, representantes legales y causahabientes, de conformidad con los términos de este instrumento.

Y NOSOTROS POR EL PRESENTE convenimos y acordamos que tenemos pleno derecho de traspasar la totalidad de la participación aquí cedida, y que no hemos suscrito, ni suscribiremos, ningún acuerdo que pueda presentar

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista el 16 de Agosto de 2001  
19 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES  
Reverendo que pueda presentar

307  
312

conflicto con el presente.

Y NOSOTROS POR EL PRESENTE convenimos y acordamos que le comunicaremos a dicho CESIONARIO, sus sucesores, representantes legales y causahabientes, cualesquiera hechos conocidos por nosotros respecto de dicha invención, y atestiguaremos en cualquier proceso judicial, firmaremos todos los papeles legales, suscribiremos todas las solicitudes divisionales, de continuación o re-expedición de solicitudes extranjeras, prestaremos todos los juramentos y en general, haremos todo lo posible para asistir a dicho CESIONARIO, a sus sucesores, representantes legales y causahabientes, para la obtención y la aplicación de la debida protección para dicha invención en todos los países.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, Hemos suscrito nuestras firmas y estampado los sellos el día y año que aparece al frente de nuestras firmas.

Fecha 3/6/2000 (Firmado) L.S.  
Congxin LIANG

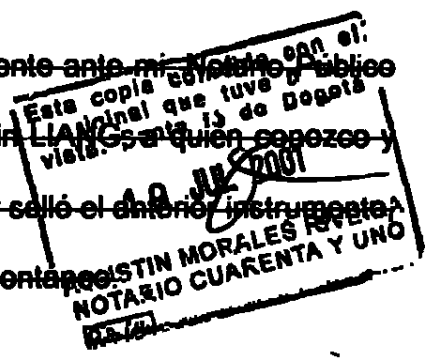
(Ver Reconocimiento Para Todo Propósito de California, adjunto)

Estado de (en blanco) \_\_\_\_\_)

Condado de (en blanco) \_\_\_\_\_)SS.:

Hoy día (en blanco) , 2000, compareció personalmente ante mí, Notario Público en y para el Estado y Condado antedichos, Congxin LIANG, a quien conozco y sé que es la persona con ese nombre, quien firmó y selló el anterior instrumento y quien lo reconoció como su propio acto libre y espontáneo.

(En blanco) Notario Público



308  
313

PATENTE DCI- 241052.1

RIEL: 010658 MARCO: 0951

Fecha Marzo 6, 2000 (Firmado) L.S.

Li SUN

(Ver Reconocimiento Para Todo Propósito de California, adjunto)

Estado de ~~(en blanco)~~ )

Condado de ~~(en blanco)~~ )SS::

~~Hoy día (en blanco), 2000, compareció personalmente ante mi, Notario Público en y para el Estado y Condado antedichos, Li SUN, a quien conozco y sé que es la persona con ese nombre, quien firmó y selló el anterior instrumento, y quien lo reconoció como su propio acto libre y espontáneo.~~

~~(En blanco) Notario Público~~

Fecha Marzo 6, 2000 (Firmado) L.S.

Chung Chen WEI

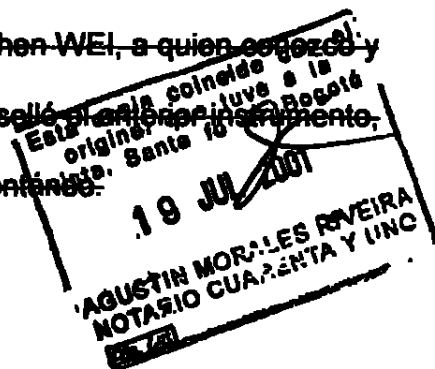
(Ver Reconocimiento Para Todo Propósito de California, adjunto)

Estado de ~~(en blanco)~~ )

Condado de ~~(en blanco)~~ )SS::

~~Hoy día (en blanco), 2000, compareció personalmente ante mi, Notario Público en y para el Estado y Condado antedichos, Chung Chen WEI, a quien conozco y sé que es la persona con ese nombre, quien firmó y selló el anterior instrumento, y quien lo reconoció como su propio acto libre y espontáneo.~~

~~(En blanco) Notario Público~~



309  
317

Fecha 3/6, 2000

(Firmado) L.S.

Peng Chao TANG

(Ver Reconocimiento Para Todo Propósito de California, adjunto)

~~Estado de (en blanco) ————)~~

~~Condado de (en blanco) ————)SS.:~~

~~Hoy día (en blanco), 2000, compareció personalmente ante mi, Notario Público en y para el Estado y Condado antedichos, Peng Chao TANG, a quien conozco y sé que es la persona con ese nombre, quien firmó y selló el anterior instrumento, y quien lo reconoció como su propio acto libre y espontáneo.~~

~~(En blanco) Notario Público~~

Fecha 3/6, 2000

(Firmado) L.S.

Gerald McMAHON

(Ver Reconocimiento Para Todo Propósito de California, adjunto)

~~Estado de (en blanco) ————)~~

~~Condado de (en blanco) ————)SS.:~~

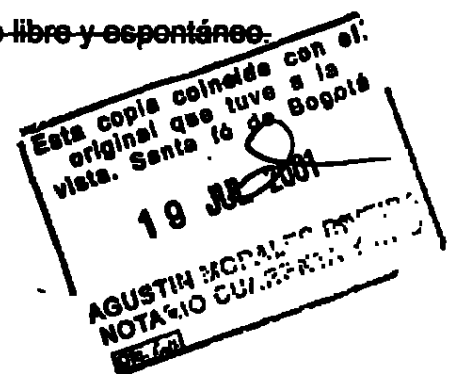
~~Hoy día (en blanco), 2000, compareció personalmente ante mi, Notario Público en y para el Estado y Condado antedichos, Gerald McMAHON, a quien conozco y sé que es la persona con ese nombre, quien firmó y selló el anterior instrumento, y quien lo reconoció como su propio acto libre y espontáneo.~~

~~(En blanco) Notario Público~~

Fecha Marzo 6, 2000

(Firmado) L.S.

Klaus Peter HIRTH



(Ver Reconocimiento Para Todo Propósito de California, adjunto)

Estado de (en blanco) \_\_\_\_\_)

Condado de (en blanco) \_\_\_\_\_)SS.:

Hoy día (en blanco), 2000, compareció personalmente ante mi, Notario Público en y para el Estado y Condado antedichos, Klaus Peter HIRTH, a quien conozco y sé que es la persona con ese nombre, quien firmó y selló el anterior instrumento, y quien lo reconoció como su propio acto libre y espontáneo.

(En blanco) Notario Público

PATENTE DCI- 241052.1

RIEL: 010658 MARCO: 0952

Fecha Marzo 6, 2000

(Firmado) L.S.

Jingrong CUI

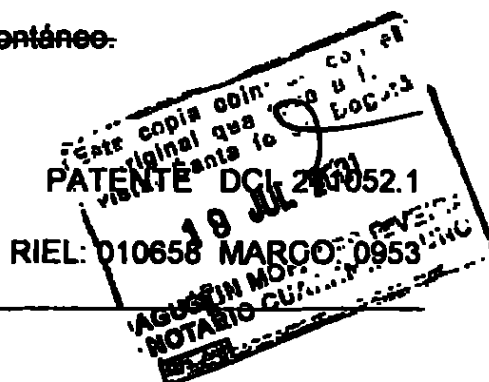
(Ver Reconocimiento Para Todo Propósito de California, adjunto)

Estado de (en blanco) \_\_\_\_\_)

Condado de (en blanco) \_\_\_\_\_)SS.:

Hoy día (en blanco), 2000, compareció personalmente ante mi, Notario Público en y para el Estado y Condado antedichos, Jingrong CUI, a quien conozco y sé que es la persona con ese nombre, quien firmó y selló el anterior instrumento, y quien lo reconoció como su propio acto libre y espontáneo.

(En blanco) Notario Público



311  
316

RECONOCIMIENTO PARA TODOS LOS FINES

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN MATEO } S.S.

El 6 de Marzo, 2000 , ante mi, Debra K. Bowen, Notario Público, (Nombre y Cargo del Funcionario (p.ej. "Jane Doe, Notario Público"), comparecieron personalmente Congxin Liang, Li Sun, Ching Chen Wei, Peng Cho tang, Gerald McMahon, Klaus Peter Hirth y Jinrong Cui, (nombres de los firmante(s)),

☒ X

a quienes conozco personalmente ó,

☐ (en blanco)

quienes presentaron pruebas basadas en evidencia suficiente

quien(es) es (son) la(s) persona(s) cuyo(s) nombre(s) está(n) suscrito(s) en el instrumento adjunto y reconoció (eron) ante mí que él(ellos) suscribió(eron) el mismo en su(s) calidad(es) de autorizado(s) y que por su(s) firma(s) sobre el instrumento la(s) persona(s) o la entidad a nombre de quien la(s) persona(s) actúa(n) suscribió(eron) el instrumento.

DA FE mi firma y sello oficial.

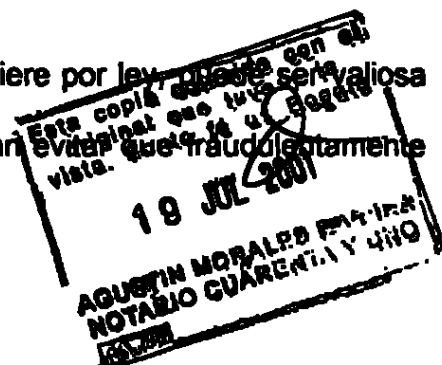
Firma: (Firmado) Debra K. Bowen

Firma del Notario Público,

(Sello a Tinta: Debra K. Bowen, Comisión # 1233154, NOTARIO PÚBLICO - CALIFORNIA, CONDADO DE MATEO, Mi Comisión expira Agosto 27, 2003).

OPCIONAL

Aunque la información a continuación no se requiere por ley, puede ser valiosa para quienes se basen en el documento y podrían evitar que fraudulentamente



01/2001  
NOTARIO  
AGUSTIN MORALES  
COMISION # 1233154  
EXPIRA AGOSTO 27, 2003

312  
317

se desprendan y se vuelvan a adjuntar otros documentos a este formulario.

Descripción del Documento Adjunto

Título o Tipo de Documento: Cesión

Fecha del Documento: Marzo 6, 2001 Número de Páginas 3 Pgs

Firmante(s) distintos a los arriba mencionados: (en blanco)

Facultad(es) Reivindicadas por el Firmante

Nombre del Firmante: (en blanco)

|           |                                                            |
|-----------|------------------------------------------------------------|
| en blanco | INDIVIDUO                                                  |
| en blanco | FUNCIONARIO CORPORATIVO-CARGO(S): <u>(en blanco)</u>       |
| en blanco | SOCIO-- <u>en blanco</u> LIMITADO <u>en blanco</u> GENERAL |
| en blanco | APODERADO                                                  |
| en blanco | SÍNDICO                                                    |
| en blanco | CUSTODIO                                                   |
| en blanco | OTRO: _____                                                |

EL FIRMANTE REPRESENTA:  
(en blanco)

HUELLA DACTILAR DEL (en blanco)  
PULGAR DERECHO  
DEL FIRMANTE

1997 Asociación Nacional de Notarios 9350 De Soto Ave, P.O. Box 2402,  
Chatsworth, CA 91313-2402 Prod. No. 5907 Pedido: Llamar a Línea Gratuita 1-  
800-876-6827.

REGISTRADO: 03/16/2000

PATENTE

RIEL: 010658 MARCO 0954  
Esta copia coincide con el original que tuve a vista. Santa Fe de Bogotá  
19 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

**APOSTILLA****(Convención de la Haya de Octubre 5 de 1961)**

1. **País: *Estados Unidos de América***  
**Este documento público**
2. **Ha sido firmado por N. WILLIAMS**
3. **Actuando en calidad de Funcionario que Certifica**
4. **Lleva el sello/estampilla de Oficina de Patentes y Marcas**

**CERTIFICADO**

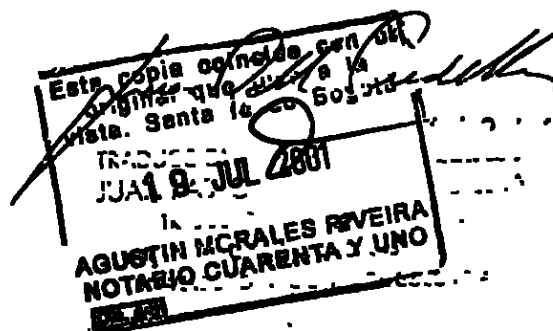
5. **En Washington D.C.**
6. **Hoy 9 de Julio, 2001**
7. **Por el *Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado de los Estados Unidos***
8. **No. 01021946-1**
9. **Sello (Sello en Relieve del Departamento de Estado de los Estados Unidos)**
10. **Firma (Firmado)**

**Fernesia T. Crawford**

-----

**ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.**

**Bogotá, Julio 16 de 2001.**

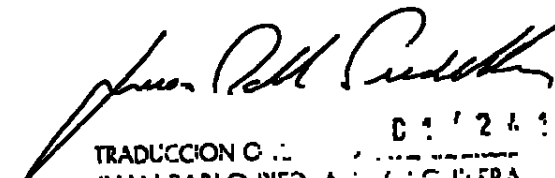


24 319

| APOSTILLA                                                                                               |                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (Convención de la Haya de Octubre 5 de 1961)                                                            |                                                                                                                                     |
| 1. País: <i>Estados Unidos de América</i>                                                               | MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES<br>448975<br>CUBA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO QUE SE PRESENTA LAS FIRMAS DE LOS PARTICIPANTES |
| Este documento público                                                                                  |                                                                                                                                     |
| 2. Ha sido firmado por N. WILLIAMS                                                                      |                                                                                                                                     |
| 3. Actuando en calidad de Funcionario que Certifica                                                     |                                                                                                                                     |
| 4. Lleva el sello/estampilla de Oficina de Patentes y Marcas                                            | NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL TEXTO<br>2001 JUL 25 A 8:22<br>EFE DE LEGALIZACIONES<br>SANTAFE DE BOGOTA D.C.                   |
| CERTIFICADO                                                                                             |                                                                                                                                     |
| 5. En Washington D.C.                                                                                   |                                                                                                                                     |
| 6. Hoy 9 de Julio, 2001                                                                                 |                                                                                                                                     |
| 7. Por el <i>Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado de los Estados Unidos</i> |                                                                                                                                     |
| 8. No. 01021946-1                                                                                       |                                                                                                                                     |
| 9. Sello (Sello en Relieve del Departamento de Estado de los Estados Unidos)                            |                                                                                                                                     |
| 10. Firma (Firmado)                                                                                     |                                                                                                                                     |
| Fernesia T. Crawford                                                                                    |                                                                                                                                     |

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, Julio 16 de 2001.

  
D 1 2 1 1  
TRADUCCION O F  
JUAN PABLO PIEDRA AGUILERA  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
C IDONEIDAD 145  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**APOSTILLE**  
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

2376 315  
NOTA  
320  
SANTAFE DE BOGOTA  
41 JUL 1 1961

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by *N. Williams*

3. acting in the capacity of *Certifying Officer*

4. bears the seal/stamp of *Patent and Trademark Office*

**Certified**

5. at Washington, D.C.

6. the *ninth* of July, 2001

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 01021946-1

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

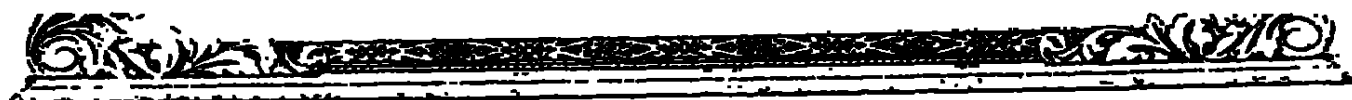
*Fernesia T. Crawford*

Fernesia T. Crawford con el.  
Esta copia coincide con el.  
original que tuvo a la  
vista. Santa Fe de Bogota

19 JUL 2001

AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO

*J. P. Aguilera*  
TRADUCCION CERTIFICADA  
JUAN PABLO PEDRAZA AGUILERA  
TRADUCCION CERTIFICADA  
C. DE BOGOTA  
BOGOTA - COLOMBIA



316 321  
A 428585  
ESTADOS UNIDOS



THE UNITED STATES OF AMERICA

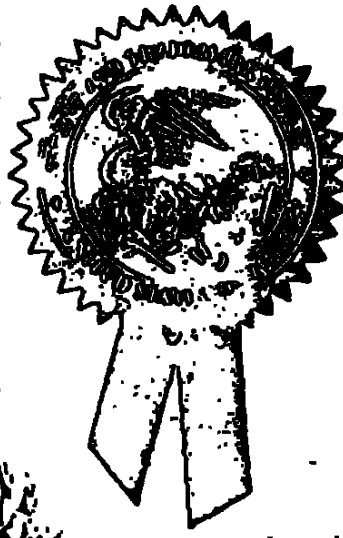
TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE  
United States Patent and Trademark Office

June 29, 2001

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE  
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON  
MARCH 16, 2000

Esta copia coincide con el  
original que tuve a la  
vista. Santa fe de Bogotà  
19 JUL 2001  
AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO



By Authority of the  
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

*N. Williams*  
N. WILLIAMS  
Certifying Officer

01/241

ANEXA

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

317  
322



03/16/00

D.F.

NOTARIA 41 DEL CIRCUITO DE  
SANTAFE DE BOGOTA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                      |                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 04-10-2000<br>101314380<br>Washington, DC 20231                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                      | Attorney Pocket Number<br>2612-1345 |
| TO THE HONORABLE<br>Please record the attached original documents or copy thereof.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                      |                                     |
| 1. Name of conveying party(ies):<br><b>Congxin LIANG; Li SUN; Chung Chen WEI;<br/>Peng Cho TANG; Gerald McMAHON; Klaus<br/>Peter HIRTH, and Jingron CUI</b><br>Additional name(s) of conveying party(ies) attached? <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No                                                                                                                                                  | 2. Name and address of receiving party(ies):<br>Name: <u>Sugen, Inc.</u><br>Address: <u>230 East Grand Avenue</u><br><u>South San Francisco, CA 94080-4811</u><br>Country (If other than USA): _____                 |                                     |
| 3. Nature of conveyance:<br><input checked="" type="checkbox"/> Assignment <input type="checkbox"/> Merger<br><input type="checkbox"/> Security Agreement <input type="checkbox"/> Change of Name<br><input type="checkbox"/> Other _____<br>Execution Date: <u>March 6, 2000</u>                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                      |                                     |
| 4. Application number(s) or patent number(s)<br>If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: _____<br>A. Patent Application No.(s) <u>60/171,288</u> B. Patent No.(s) _____<br>Additional numbers attached? <input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                      |                                     |
| 5. Name and address of party to whom correspondence concerning documents should be mailed:<br><b>PENNIE &amp; FIDMORON LLP<br/>1607 K Street, N.W.<br/>Washington, D.C. 20006</b>                                                                                                                                                                                                                                                        | 6. Number of applications and patents involved: <u>1</u><br>7. Total fee (37 CFR 3.41): <u>\$ 40.00</u><br>Please charge to the deposit account listed in Section 8.<br>8. Deposit account number:<br><u>16-1150</u> |                                     |
| DO NOT USE THIS SPACE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                      |                                     |
| 9. Statement and signature.<br><i>To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.</i><br><u>Max Bachrach</u> <u>P-45,479</u> <u>Max Bachrach</u> <u>March 16, 2000</u><br>For: <u>Laura A. Coruzzi</u> (Reg. No. 30,742) Signature Date<br>Name of Person Signing Reg. No.<br>Total number of pages including cover sheet: <u>5</u> |                                                                                                                                                                                                                      |                                     |

04/06/2000 TTX011 00000148 161150 60171288  
01 FC1281 40.00

01 / 2 / 1

TRADE MARK  
JUAN PABLO  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Mail documents to be recorded with required conveyance information to  
Comptroller of Patents & Trademarks, Inc.  
Washington, D.C. 20231  
COPIA COINCIDE CON OTRO  
COPIA AUTENTICADA QUE TIENE A TO  
VISTA. Santa fe de Bogota.  
1 JUL. 19 2001  
AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO PUBLICO  
NORMA 01-010668 FRAME: 0960

318

323

JOINT

NOTARIA 41 DEL CIRCULO DE  
SANTIADE DE BOGOTA

ASSIGNMENT

WHEREAS, WE, Congxin LIANG, citizen of the People's Republic of China, residing at 726 West Remington Ave, Sunnyvale, CA 94087-2242; Li SUN, citizen of the People's Republic of China, residing at 64 Rockharbor Lane, Foster City, CA 94404; Chung Chen WEI, citizen of the United States, residing at 39 Commons Lane, Foster City, CA 94404; Peng Cho TANG, citizen of the United States, residing at 827 Camino Ricardo, Moraga, CA 94556; Gerald McMAHON, citizen of the United States, residing at 1800 Schultz Road, Kenwood, CA 93452; Klaus Peter HIRTH, citizen of the United States, residing at 334 Collingwood Street, San Francisco, CA 94114 and Jiaorong CUI, citizen of the People's Republic of China, residing at 653 Catamaran Street, #3, Foster City, CA 94404, ASSIGNORS, are the inventors of the invention in 4-SUBSTITUTED 7-AZA-INDOLIN-3-ONES AS PROTEIN KINASE INHIBITORS for which we have executed an Provisional application for a Patent of the United States

- ☐ which is executed on ☐ even date herewith or ☐ \_\_\_\_\_
- ☒ which is identified by Pennie & Edmonds as docket no. 7683-156-888
- ☒ which was filed on December 21, 1999, Application No. 60/171,288

and WHEREAS, Sugan, Inc., having an office for the transaction of business at 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080-4811, ASSIGNEE is desirous of obtaining our entire right, title and interest in, to and under the said invention and the said application:

NOW, THEREFORE, in consideration of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, we, the said ASSIGNORS, have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do hereby sell, assign, transfer and set over, unto the said ASSIGNEE, its successors, legal representatives and assigns, our entire right, title and interest in, to and under the said invention, and the said United States provisional application and all applications claiming priority thereto under 35 U.S.C. §119(e) and divisions, renewals and continuations thereof, and all Patents of the United States which may be granted thereon and all reissues and extensions thereof; and all applications for industrial property protection, including, without limitation, all applications for patents, utility models, and designs which may hereafter be filed for said invention in any country or countries foreign to the United States, together with the right to file such applications and the right to claim for the same the priority rights derived from said United States application under the Patent Laws of the United States, the International Convention for the Protection of Industrial Property, or any other international agreement or the domestic laws of the country in which any such application is filed, as may be applicable; and all forms of industrial property protection, including, without limitation, patents, utility models, inventors' certificates and designs which may be granted for said invention in any country or countries foreign to the United States and all extensions, renewals and reissues thereof;

AND WE HEREBY authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States, and any Official of any country or countries foreign to the United States, whose duty it is to issue patents or other evidence or forms of industrial property protection on applications as aforesaid, to issue the same to the said ASSIGNEE, its successors, legal representatives and assigns, in accordance with the terms of this instrument.

AND WE HEREBY covenant and agree that we have full right to convey the entire interest herein assigned, and that we have not executed, and will not execute, any agreement in conflict herewith.

AND WE HEREBY further covenant and agree that we will communicate to the said ASSIGNEE, its successors, legal representatives and assigns, any facts known to us respecting said invention, and testify in any legal proceeding, sign all lawful papers, execute all divisional, continuing, reissue and foreign applications, make all rightful oaths, and generally do everything possible to aid the said ASSIGNEE, its successors, legal representatives and assigns, to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries.

IN TESTIMONY WHEREOF, We hereunto set our hands and seals the day and year set opposite our respective signatures.

Date 3/1/2001, 2000 Congxin Liang L.S.  
Congxin LIANG

State of \_\_\_\_\_  
County of \_\_\_\_\_ } SS.:

On this \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_, 2000, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared Congxin LIANG to me known and known to me to be the person of that name, who signed and sealed the foregoing instrument, and he acknowledged the same to be his free act and deed.

\_\_\_\_\_  
Notary Public.

TRADUCCION  
JUAN PABLO  
DE  
SANTIADE DE BOGOTA

Esta copia coincide con otra  
ya autenticada por mi a la  
fecha de esta autenticación  
REEL: 010668 FRAME: 0961  
JUL 19 2001  
AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO  
(P.E. 2001)

321  
SANTAFE DE BOGOTA  
CINCUENTA DE

MAR 6, 2000 LI SUN L.S.  
 of ) SS.:  
 County of )  
 On this day of SEE ATTACHED INSTRUMENT, 2000, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared LI SUN to me known and known to me to be the person of that name, who signed and sealed the foregoing instrument, and he acknowledged the same to be his free act and deed.  
 \_\_\_\_\_  
 Notary Public.

Date MAR 6, 2000 Chung Chen Wei L.S.  
 State of )  
 County of ) SS.:  
 On this day of SEE ATTACHED INSTRUMENT, 2000, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared Chung Chen Wei to me known and known to me to be the person of that name, who signed and sealed the foregoing instrument, and he acknowledged the same to be his free act and deed.  
 \_\_\_\_\_  
 Notary Public.

Date 3/6, 2000 Peng Cho TANG L.S.  
 State of )  
 County of ) SS.:  
 On this day of SEE ATTACHED INSTRUMENT, 2000, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared Peng Cho TANG to me known and known to me to be the person of that name, who signed and sealed the foregoing instrument, and he acknowledged the same to be his free act and deed.  
 \_\_\_\_\_  
 Notary Public.

Date 3/6, 2000 Gerald McMAHON L.S.  
 State of )  
 County of ) SS.:  
 On this day of SEE ATTACHED INSTRUMENT, 2000, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared Gerald McMAHON to me known and known to me to be the person of that name, who signed and sealed the foregoing instrument, and he acknowledged the same to be his free act and deed.  
 \_\_\_\_\_  
 Notary Public.

Date MAR 6, 2000, 2000 Klaus Peter HIRTH L.S.  
 State of )  
 County of ) SS.:  
 On this day of SEE ATTACHED INSTRUMENT, 2000, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared Klaus Peter HIRTH to me known and known to me to be the person of that name, who signed and sealed the foregoing instrument, and he acknowledged the same to be his free act and deed.  
 \_\_\_\_\_  
 Notary Public.

TRADUCCION DE  
JUAN LOPEZ

Esta copia coincide con otra  
 copia autenticada que tuve a la  
 vista. Santa Fe de Bogota.  
 JUL 19 2000  
 AGUSTIN MORALES RIVEIRA  
 NOTARIO CUARENTA Y UNO

PATENT  
REEL: 010658 FRAME: 0952

320

325

SANTAFE DE BOGOTA

11 JUL. 2000

MAR 6. 2000

Jingrong CUI

County of

SS.:

SEE ATTACHED  
ORIGINAL INSTRUMENT

On this day of 2000, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared Jingrong CUI to me known and known to me to be the person of that name, who signed and sealed the foregoing instrument, and he acknowledged the same to be his free act and deed:

Notary Public.

Esta copia coincide con otro  
Copia autenticada que tuve a la  
vista. Santa Fe de Bogotá.  
JUL. 19 2000  
AGUSTIN MORALES RIVERA  
NOTARIO CUARENTA Y UNO  
[RE: ART]

PATENT DC1-361821  
REEL: 010658 FRAME: 0953

NOTARIAL ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

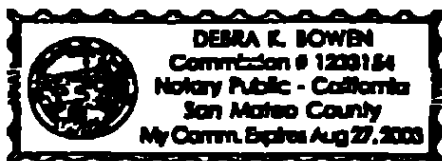
County of SAN MATEO

ss.

On March 6, 2000 before me, Debra K. Bowen, Notary Public, Congxin Liang, Li Sun, Chung Chen Wei, Peng Cho Tang, personally appeared Gerald McMahon, Klaus Peter Hirth and Jingrong Cui.

personally known to me
proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Signature of Notary Public

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: ASSIGNMENT

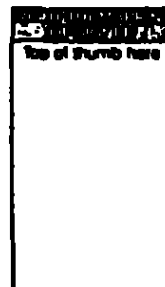
Document Date: MAR. 6, 2000 Number of Pages: 3885

Signer(s) Other Than Named Above:

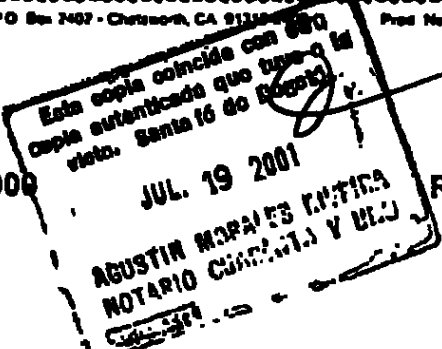
Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: Individual
Corporate Officer — Title(s):
Partner — Limited | General
Attorney In Fact
Trustee
Guardian or Conservator
Other:

Signer Is Representing:



RECORDED: 03/16/2000



PATENT

REEL: 010658 FRAME: 0954

VERIFIED
ORIGINAL
MAR 16 2000

**7-AZA-INDOLIN-2-ONAS SUSTITUÍDAS EN 4 Y SU USO COMO**  
**INHIBIDORES DE PROTEÍNA QUINASA**

**1. CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a inhibidores de proteína quinasa, composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que los incluyen, y métodos para su uso para el tratamiento y prevención de una enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer.

**2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

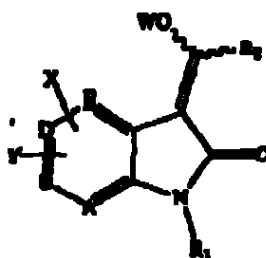
La transducción de la señal celular es un mecanismo por medio del cual los estímulos externos que regulan los procesos celulares se transmiten desde los receptores en la superficie de una célula a su interior. Uno de los mecanismos bioquímicos clave de transducción de la señal involucra la fosforilación reversible de proteínas. El grado de fosforilación de una proteína, que puede afectar su conformación, actividad enzimática, y localización celular, se modifica a través de las acciones recíprocas de las proteína quinasas ("PKs") y de las proteína fosfatasas. Así, la regulación o falta de regulación de las proteína quinasas puede tener un gran efecto sobre el comportamiento celular.

Durante la transducción de la señal celular, la función de cada receptor quinasa está determinada por su patrón de expresión, disponibilidad de ligando, y la matriz de las vías transducción de la señal descendente que activa. Un ejemplo de una vía incluye una cascada de la tirosina quinasas del receptor de Factor de Crecimiento ("RTKs"), tales como EGF-R, PDGF-R, VEGF-R, IGF1-R, y el Receptor de Insulina, que entregan señales por medio de la fosforilación a otras quinasas, tales como Src tirosina quinasa y Raf, Mek,

y Erk serina/treonina quinasas. Véase, por ejemplo, Davis, B. D., *et al.*, *Microbiology* 838-841 (4<sup>a</sup> ed., 1990); y Brott, B.K., *et al.*, *Cell Growth Differ.* 4(11):921-929 (1993). Cada una de esas quinasas juega roles relacionados, pero funcionalmente distintos. La pérdida de regulación de la vía de señalización del Factor de Crecimiento ocurre con frecuencia en estados de enfermedad como el cáncer.

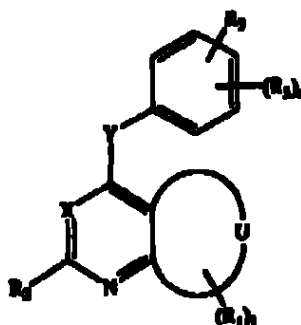
Se ha demostrado que la expresión aberrante de, o las mutaciones en proteína quinasas llevan tanto a proliferación celular descontrolada (por ejemplo, crecimiento de tumor maligno) o a defectos en procesos clave relacionados con el desarrollo. Las proteína quinasas han sido relacionadas como objetivos en desórdenes del sistema nervioso central (tales como Alzheimer), desórdenes inflamatorios (tales como psoriasis), enfermedades del hueso (tales como osteoporosis), aterosclerosis, restenosis, trombosis, desórdenes metabólicos (tales como diabetes), y enfermedades infecciosas (tales como infecciones virales y fúngicas).

Se ha dirigido una significativa cantidad de investigación al descubrimiento de compuestos que afectan actividad de proteína quinasa debido a que la regulación y/o inhibición de las proteína quinasas puede ayudar en el tratamiento y/o prevención de una variedad de enfermedades. Esta investigación es similar a la que podría haber llevado al descubrimiento de los compuestos revelados por la solicitud WO 91/09598 PCT y la Patente de los EEUU N° 5.811.432, que tienen la fórmula

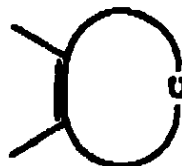


donde uno de A, B, D, y E es nitrógeno y los otros son carbono; X e Y puede ser, por ejemplo, halógeno u oxhidrilo; R<sub>1</sub> es alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) o una amida; R<sub>2</sub> es alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), preferiblemente alquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y W es, por ejemplo, hidrógeno o alcanilo(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>). Estos compuestos, que no se ha informado que sean inhibidores de quinasa, supuestamente son inhibidores de la biosíntesis de prostaglandina H<sub>2</sub> sintetasa, 5-lipooxigenasa, e interleuquina-1, y supuestamente son agentes anti-inflamatorios y analgésicos.

En la Solicitud PCT WO 97/13771 se revelan ejemplos de compuestos que supuestamente son inhibidores de proteína quinasa. Estos compuestos tienen la fórmula:

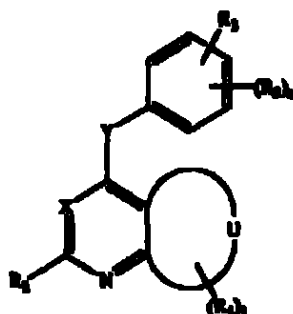


donde X es nitrógeno o CH; R<sub>2</sub>, Y, R<sub>3</sub>, y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente de entre una gran cantidad de unidades; el grupo



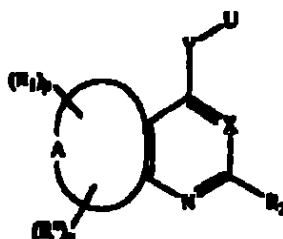
representa, por ejemplo, un anillo heterocíclico de 5 miembros; y cada  $R_1$  representa independientemente un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros.

La solicitud PCT WO 98/02437 revela compuestos de estructura similar a aquellos descritos arriba, es decir:



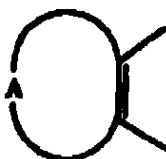
Como arriba,  $R_1$  representa un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros. Estos compuestos también son supuestamente inhibidores de proteína tirosina quinasa.

La solicitud PCT WO 98/02438 revela compuestos de la fórmula:



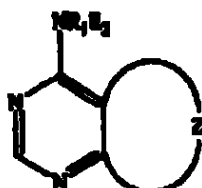
donde X es nitrógeno o CH;  $R_1$ ,  $R_2$ , e Y se seleccionan independientemente de entre una gran cantidad de unidades; U es un sistema mono o bicíclico de

anillos de 5 a 10 miembros; el grupo

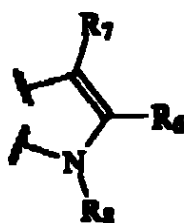


representa, por ejemplo, un anillo heterocíclico de 5 miembros; y R'' representa un grupo fenilo o un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros. Estos compuestos supuestamente también son inhibidores de proteína tirosina quinasa.

La solicitud PCT WO 98/23813 revela compuestos de la fórmula:

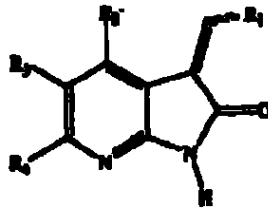


donde Z se puede un grupo de la fórmula



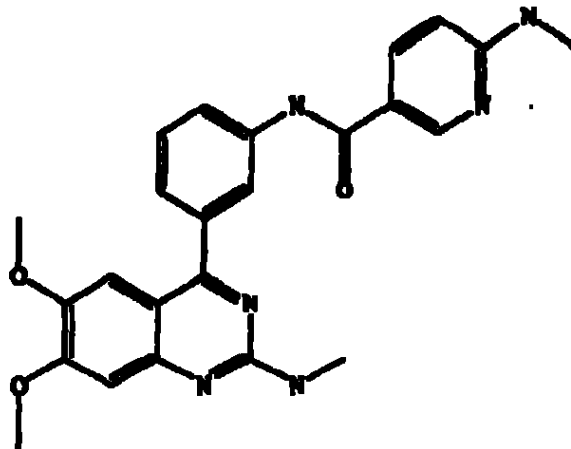
y R<sub>9</sub> es H, halógeno, ciano, alquilo, o alquilo sustituido. Supuestamente se pueden usar estos compuestos en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas como el cáncer.

La solicitud PCT WO 99/21859 revela compuestos de la fórmula:



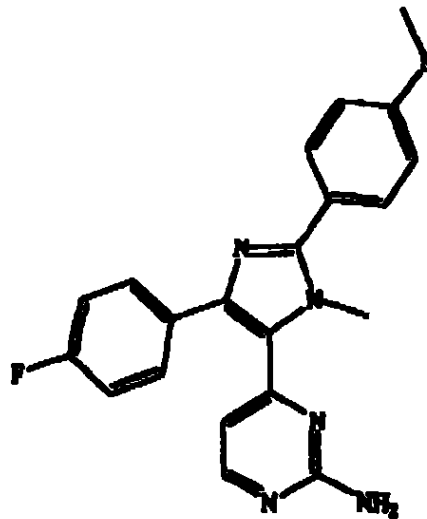
donde los grupos R se definen de distintas maneras. Se ha informado que estos compuestos son útiles como inhibidores de proteína quinasa.

La solicitud PCT WO 99/37622 revela un compuesto de la fórmula:

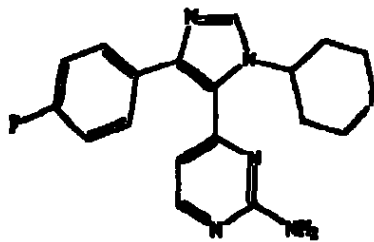


que supuestamente es útil como antagonista PDE4 y TNF- $\alpha$ .

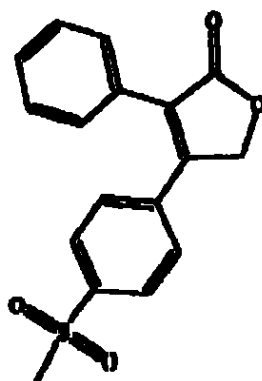
La Patente de los EEUU N° 5.916.891 revela un compuesto de la fórmula:



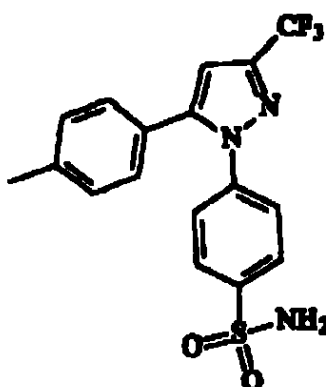
que es un derivado del compuesto de fórmula:



que supuestamente es un inhibidor p38/Raf. Ambos compuestos comparten características estructurales con el rofecoxib, que Merck vende con la marca Vioxx<sup>®</sup> y que tiene la fórmula:



y celecoxib, que vende Monsanto y que tiene la fórmula:



Los ejemplos finales de compuestos que supuestamente son útiles como inhibidores de proteína quinasa se revelan en Las solicitudes PCT WO 87/04928 y WO 96/16964.

A pesar de la gran cantidad de compuestos que se ha informado que inhiben la actividad de proteína quinasa, aún existe una necesidad de compuestos que se puedan usar en el tratamiento y/o prevención del cáncer y otras enfermedades en humanos. En parte, esto se debe a la biodisponibilidad, toxicidad, y otros problemas que hacen que muchos de los inhibidores de

proteína quinasa conocidos no sean apropiados para su desarrollo clínico.

Por lo tanto la presente invención está dirigida en parte a compuestos que modulan la transducción de la señal por proteína quinasa ("PK") afectando la actividad enzimática de las tirosina quinasas y por lo tanto interfiriendo con las señales que ellas transducen. Más en particular, la presente invención se dirige a compuestos que modulan las vías de transducción de la señal mediadas por RTK, tirosina quinasa celular ("CTK") y/o serina/treonina quinasa ("STK") como un enfoque terapéutico para tratar muchas clases de tumores sólidos, incluyendo por ejemplo: carcinomas, sarcomas incluyendo el sarcoma de Kaposi, leucemia, eritroblastoma, glioblastoma, meningioma, astrocitoma, melanoma y mioblastoma. Otras indicaciones específicas relacionadas incluyen, por ejemplo, cánceres cerebrales, cánceres de vejiga, cánceres de ovarios, cánceres gástricos, cánceres de páncreas, cánceres de colon, cánceres de la sangre, cánceres de pulmón, cánceres de hueso y leucemias.

Otros ejemplos adicionales, sin limitación, de los tipos de desórdenes relacionados con la actividad PK no regulada donde los compuestos descritos aquí pueden ser útiles para impedir, tratar y/o estudiar, son los desórdenes proliferativos celulares, desórdenes fibróticos y desórdenes metabólicos. Los desórdenes proliferativos celulares, que se pueden impedir, tratar o además estudiar mediante la presente invención incluyen cánceres, desórdenes proliferativos de los vasos sanguíneos y desórdenes proliferativos celulares mesangiales.

Los desórdenes proliferativos de los vasos sanguíneos se refieren a desórdenes angiogénicos y vasculogénicos que generalmente provocan la en proliferación anormal de vasos sanguíneos. La formación y dispersión de vasos

sanguíneos, o vasculogénesis y angiogénesis, respectivamente, juegan papeles importantes en una variedad de procesos fisiológicos tales como desarrollo embrionario, formación del cuerpo lúteo, curación de heridas y regeneración de órganos. También juegan un rol axial en el desarrollo del cáncer. Otro ejemplos de desórdenes de la proliferación de vasos sanguíneos incluyen la artritis, donde vasos sanguíneos capilares nuevos invaden la articulación y destruyen al cartílago, y enfermedades oculares, como *retinopatía diabética*, donde los capilares nuevo en la retina invaden el cuerpo vítreo, sangran y causan ceguera. A la inversa, también están relacionados los desórdenes relacionados con la encogimiento, contracción u obturación de vasos sanguíneos, tales como *estenosis*.

Los desórdenes fibróticos se refieren a la formación anormal de matrices extracelulares. Los ejemplos de desórdenes fibróticos incluyen *cirrosis hepática* y desórdenes proliferativos celulares mesangiales. La cirrosis hepática se caracteriza por el aumento en los constituyentes de la matriz extracelular que causan la formación de una cicatriz hepática. La cirrosis hepática puede causar enfermedades tales como la cirrosis del hígado. Una infección viral como la hepatitis también puede causar el aumento de la matriz extracelular que causa una cicatriz hepática. Los lipocitos parecen representar uno de los papeles más importantes en la cirrosis hepática. Otros desórdenes fibróticos relacionados incluyen la *ateroesclerosis*.

Los desórdenes proliferativos celulares mesangiales se refieren a desórdenes causados por la proliferación anormal de células mesangiales. Los desórdenes proliferativos mesangiales incluyen diferentes enfermedades renales humanas, tales como *glomerulonefritis*, *nefropatía diabética*,

nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica, rechazo de trasplantes, y glomerulopatías. La PDGF-R se ha relacionado con el mantenimiento de la proliferación celular mesangial. Floege et al., *Kidney International* 43:47S-54S (1993).

Como se señaló con anterioridad, las PKs han sido asociadas con dichos desórdenes proliferativos celulares. Por ejemplo, algunos miembros de la familia RTK han sido asociados con el desarrollo del cáncer. Algunos de esos receptores, como el EGFR (Tuzi et al., *Br. J. Cancer* 63:227-233 (1991); Torp et al., *APMIS* 100:713-719 (1992)) HER2/neu (Slamon et al., *Science* 244:707-712 (1989)) y PDGFR (Kumabe et al., *Oncogene*, 7:627-633 (1992)) se encuentran sobre-expresados en muchos tumores y/o están activados persistentemente por bucles autocrinos. De hecho, se han demostrado esas sobre-expresiones de los receptores en los cánceres más comunes y severos Akbasak y Suner-Akbasak et al., *J. Neurol. Sci.*, 111:119-133 (1992); Dickson et al., *Cancer Tratamiento Res.* 61:249-273 (1992); Korc et al., *J. Clin. Invest.* 90:1352-1360 (1992)) y bucles autocrinos (Lee y Donoghue, *J. Cell. Biol.*, 118:1057-1070 (1992); Korc et al., *supra*; Akbasak y Suner-Akbasak et al., *supra*). Por ejemplo, se ha asociado al EGFR con el carcinoma de células escamosas, astrocitoma, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga. El HER2 se ha asociado con cáncer de mamas, de ovarios, gástrico, de pulmón, de páncreas y de vejiga. El PDGFR se ha asociado con glioblastoma, cáncer de pulmón, de ovarios, melanoma y de próstata. El RTK c-met se ha asociado en general con la hepatocarcinogénesis y así con carcinoma hepatocelular. C-met se ha relacionado con formación de tumores malignos. Más específicamente, el RTK c-met se ha asociado entre

otros cánceres, con carcinoma colorectal, de tiroides, pancreático y gástrico, leucemia y linfoma. Además, la sobre-expresión del gen c-met se ha detectado en pacientes con enfermedad de Hodgkins, enfermedad de Burkitts, y la línea celular del linfoma. Flk se ha asociado con un amplio espectro de tumores incluyendo sin limitación tumores de mamas, de ovarios y pulmón así como gliomas tales como glioblastoma.

Además de estar relacionado con el sustento nutricional y con la diabetes de tipo-II, también se ha asociado al IGF-IR, con varios tipos de cánceres. Por ejemplo, el IGF-I se ha identificado como un estimulador autocrino del crecimiento para varios tipos de tumores, por ejemplo, células de carcinoma de cáncer de mamas humano (Arteaga et al., *J. Clin. Invest.* 84:1418-1423 (1989)) y células de pequeño tumor pulmonar (Macauley et al., *Cancer Res.*, 50:2511-2517 (1990)). Además, el IGF-I, totalmente involucrado en el crecimiento normal y la diferenciación del sistema nervioso, parece ser un estimulador autocrino de gliomas humanos. Sandberg-Nordqvist et al., *Cancer Res.* 53:2475-2478 (1993). La importancia del IGF-IR y sus ligandos en la proliferación celular está sustentada además por el hecho de que el IGF-I estimula el crecimiento de muchos tipos celulares en cultivo (fibroblastos, células epiteliales, células de músculo liso, linfocitos-T, células mieloides, condrocitos, osteoblastos, las células indiferenciadas de la médula del hueso). Goldring y Goldring, *Eukaryotic Gene Expression*, 1:301-326 (1991). En una serie de publicaciones recientes, Baserga aún sugiere que el IGF-IR juega un papel central en los mecanismos de transformación y, como tal, podría ser un objetivo preferido para intervenciones terapéuticas para un amplio espectro de malignidades humanas. Baserga, *Cancer Res.*, 55:249-252 (1995); Baserga,

*Cell*, 79:927–930 (1994); Coppola et al., *Mol. Cell. Biol.*, 14:4588–4595 (1994). Los STKs han sido relacionados con muchos tipos de cáncer incluyendo notablemente cáncer de mamas. Cance, et al., *Int. J. Cancer*, 54:571–77 (1993).

Sin embargo, las asociaciones entre actividad PK anormal y enfermedad no se restringen al cáncer. Por ejemplo, los RTKs han sido asociados con enfermedades tales como psoriasis, diabetes mellitus, endometriosis, angiogénesis, desarrollo de placas ateromatosas, enfermedad de Alzheimer, hiperproliferación epidérmica y enfermedades neurodegenerativas, degeneración macular relacionada con la edad, hemangiomas. Por ejemplo, se indica EGFR en la curación de heridas corneales y dérmicas. En diabetes mellitus de tipo-II se han indicado deficiencias de Insulina-R y del IGF-1R. En Plowman et al., *DN&P* 7:334–339 (1994) puede encontrarse una correlación más completa entre RTKs específicas y sus indicaciones terapéuticas.

Como se señaló anteriormente, no sólo los RTKs sino también los CTKs, también incluyendo, por ejemplo, src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr e Yrk (revisado por Bolen et al., *FASEB J.*, 6:3403–3409 (1992)) se hallan relacionados con la transducción de la señal de las vías proliferativa y metabólica y así se podría esperar, y de hecho se ha demostrado que están involucrados en muchos desórdenes mediados por PTK a los cuales se dirige la presente invención. Por ejemplo, se ha demostrado que la src (v-src) mutado es una oncoproteína (pp60<sup>v-src</sup>) en pollos. Además, su homólogo celular, el proto-oncogen pp60<sup>c-src</sup> transmite señales oncogénicas de muchos receptores. Por ejemplo, la sobre-expresión de EGFR o HER2/neu en tumores lleva a la activación constitutiva de pp60<sup>c-src</sup>, que es característica de la célula

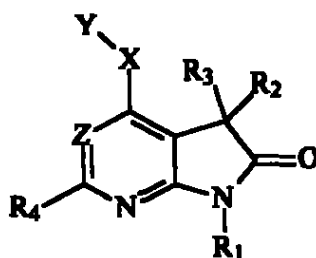
maligna pero no se encuentra en la célula normal. Por otro lado, ratones deficientes en la expresión de c-src muestran un fenotipo osteopetéctico, que indica una participación clave del c-src en la función osteoclasto y una posible vinculación con desórdenes relacionados. En forma similar, el Zap70 se relaciona con la señalización de Células T.

Las PKs han sido relacionadas con otras enfermedades y desórdenes. Por ejemplo, las STKs han sido asociadas con inflamación, enfermedad autoinmune, inmunorrespuestas, e hiperproliferación tales como retinosis, fibrosis, psoriasis, osteoartritis y artritis reumatoidea. Las PKs también se han relacionado con la implantación del embrión y los compuestos de la presente invención pueden proporcionar un método efectivo para impedir la implantación del embrión. Finalmente, en la actualidad se sospecha que tanto RTKs como CTKs están involucradas en desórdenes hiperinmunes.

### 3. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención abarca las novedosas 7-aza-indolin-2-onas 4-sustituídas, composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que los incluyen, métodos para su uso como inhibidores de proteína quinasa, y métodos para su uso para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

A primera forma de realización de la invención abarca un compuesto de la fórmula 1



1

o una sal aceptable para uso farmacéutico, solvato, clatrato, o prodroga de los mismos, donde:

R<sub>1</sub> es H o metilo;

Cada una de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es independientemente H, halógeno, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), o alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>); o R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> tomados juntos forman un metilindeno opcionalmente sustituido o un anillo de 3 a 7 miembros que opcionalmente incluye 0-3 heteroátomos;

R<sub>4</sub> es H, metilo, trifluorometilo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), alcoxi, amido, amino, o arilo opcionalmente sustituido;

X es una unión química, etinil, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O<sub>2</sub>)-, -NR<sub>5</sub>C(O)-, o -NR<sub>5</sub>-, donde R<sub>5</sub> es H, metilo, o metileno sustituido;

Y es un anillo aromático de 5 a 10 miembros mono o bicíclico, saturado, insaturado, o que incluye 0-3 heteroátomos y opcionalmente sustituido; y

Z es N o CR<sub>6</sub>, donde R<sub>6</sub> es H, halógeno, nitro, ciano, alcoxilo, sulfonamida, amino, o amida.

Los compuestos preferidos de la fórmula 1 son aquellos en los que X es una unión química, -O-, -S-, o -NR<sub>5</sub>-.

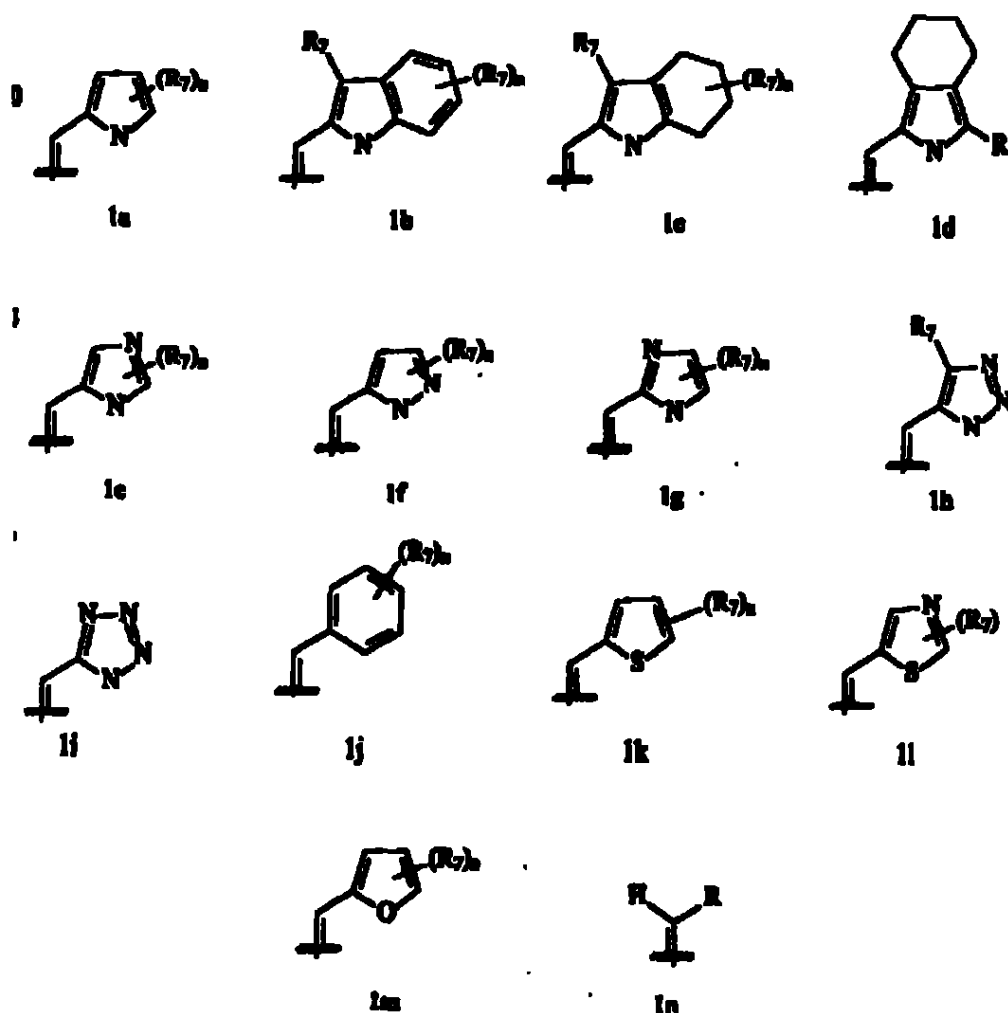
Los compuestos preferidos de la fórmula 1 adicionales son aquellos en los que Y se selecciona entre el grupo que consiste en fenilo, indolilo, indolinilo, 1H-indazolilo, 2,3-dihidro-1H-indazolilo, 1H-bencimidazolilo, 2,3-dihidro-1H-bencimidazolilo, benzotriazolilo, piridilo, pirimidilo, piperazin-1-ilo 4-sustituido, morfolino, piperidinilo, pirrolidin-1-ilo, furanilo, tiofenilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, piridopirrolilo, piridazopirrolilo, pirimidopirrolilo, pirazopirrolilo, piridofuranilo, y derivados de los mismos.

Los compuestos preferidos de la fórmula 1 adicionales son aquellos en los que Z es N o CH.

Los compuestos preferidos de la fórmula 1 adicionales son aquellos en los que R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son ambos H, halógeno, o metilo.

Los compuestos preferidos de la fórmula 1 adicionales son aquellos en los que R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se toman juntos para formar un anillo seleccionado de entre el grupo que consiste en 1,3-dioxolano, 1,3-dioxano, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo.

Los compuestos preferidos de la fórmula 1 adicionales son aquellos en los que R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se toman juntos para formar un metilindeno opcionalmente sustituido seleccionado de entre aquellos de fórmulas 1a-1n:



donde:

$n$  es un entero de 0-3;

cada  $R_7$  es independientemente H, alquilo, ácido carboxílico, amina, halógeno, nitró, ciano,  $X_1$ ,  $X_2$ -(C-C<sub>4</sub>)alquil- $R_8$ ,  $X_2$ -(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquenil- $R_8$ , o  $X_2$ -(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquinil- $R_8$ ;

$X_1$  es -C(O)NR<sub>9</sub>-, -NR<sub>9</sub>C(O)-, -C(O)O-, C(O)R<sub>11</sub>-, -OC(O)-, -O-, -NR<sub>9</sub>-, -S-, -S(O<sub>2</sub>), o -S(O<sub>2</sub>)NR<sub>9</sub>-;

$X_2$  es una unión química,  $-C(O)NR_9-$ ,  $-NR_9C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $C(O)R_{11}$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-NR_9-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O_2)-$ , o  $-S(O_2)NR_9-$ ;

$R_8$  se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, dialquilamino, carboxilo, oxhidrilo, alcoxi, sulfonamida, urea, carbamato, diol, alquilsulfonilo, y  $R_{10}$ ;

$R_9$  es H o alquilo( $C_1-C_3$ );

$R_{10}$  es un heterociclo saturado, insaturado, o aromático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido que incluye entre 1 y 4 heteroátomos; y

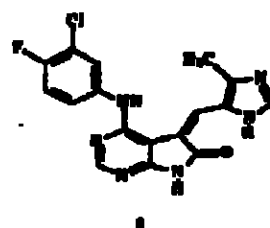
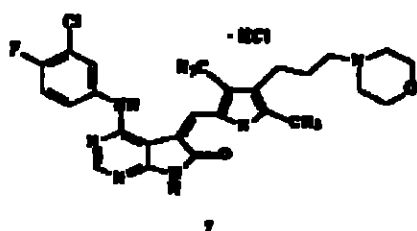
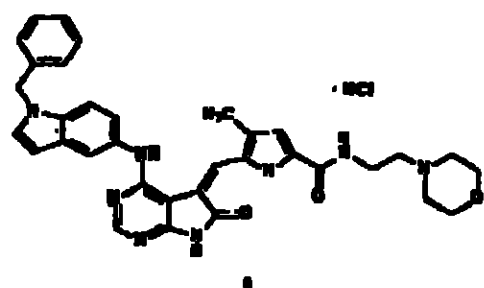
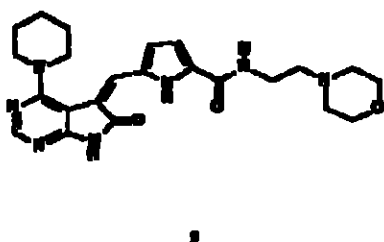
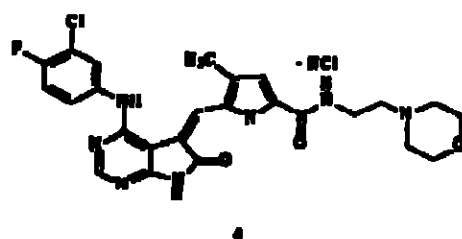
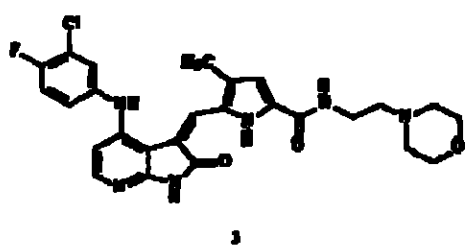
$R_{11}$  es un anillo heterocíclico saturado de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido.

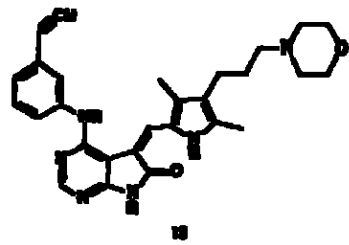
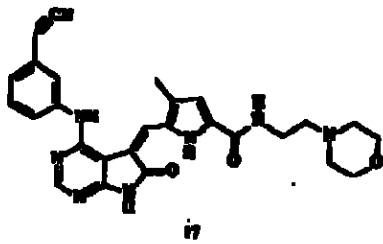
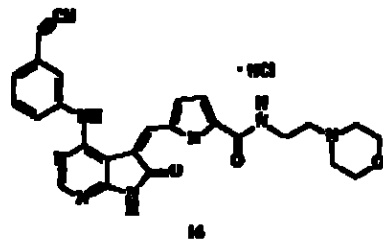
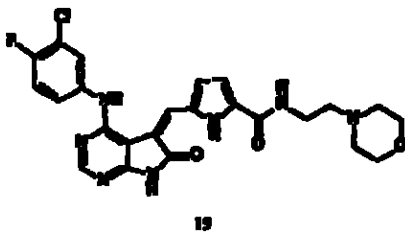
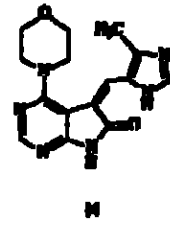
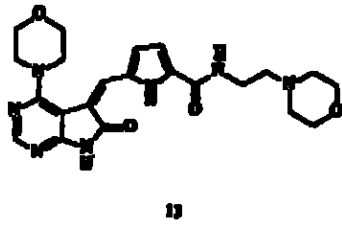
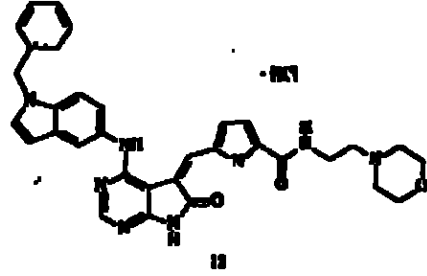
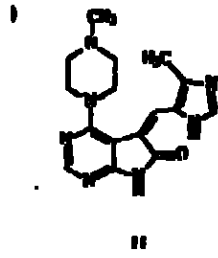
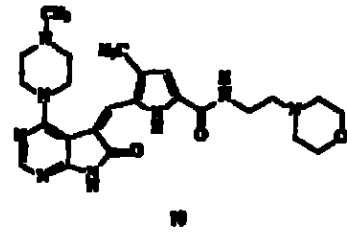
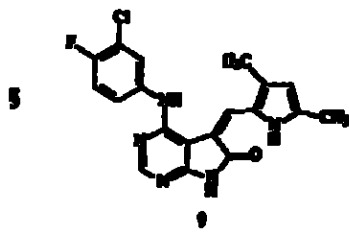
En más compuestos preferidos de la invención,  $R_7$  es  $X_2-(C_1-C_4)$ alquil- $R_8$ ,  $X_2-(C_1-C_4)$ alquenil- $R_8$ , o  $X_2-(C_1-C_4)$ alquinil- $R_8$ , y  $R_8$  se selecciona entre el grupo que consiste en alquilsulfonilo, alcoxi, carboxilo, morfolino, 1-alquil-piperazin-4-ilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piridilo, imidazol, triazol, tetrazol, y tiazol.

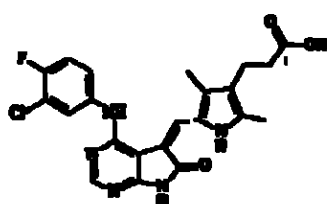
Compuestos preferidos adicionales de la invención son aquellos de la fórmula 1 donde  $R_4$  es H, metilo, o trifluorometilo.

Compuestos preferidos adicionales de la invención son aquellos de la fórmula 1 donde si Z es CH,  $R_1$  es  $CH_3$  o  $R_3$  y  $R_2$  no forma un metilindeno opcionalmente sustituido.

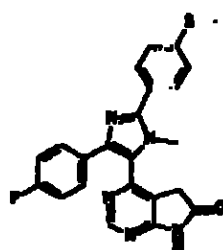
Los compuestos específicos preferidos de la invención son aquellos de fórmulas 3-54:



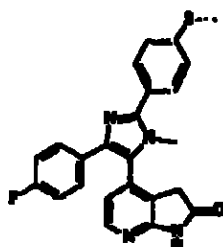




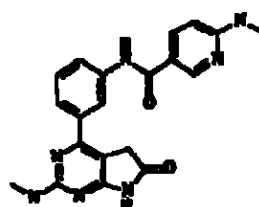
19



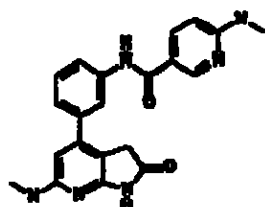
20



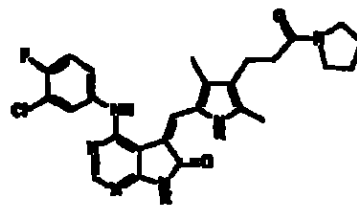
21



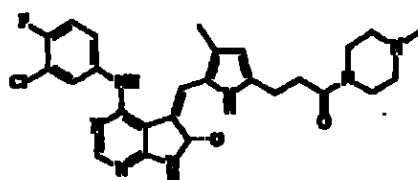
22



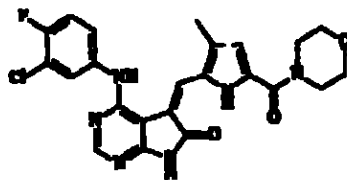
23



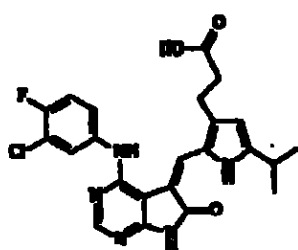
24



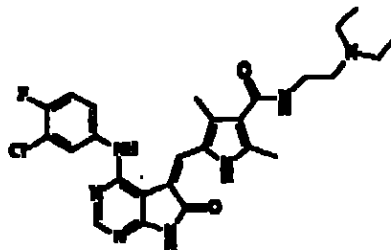
25



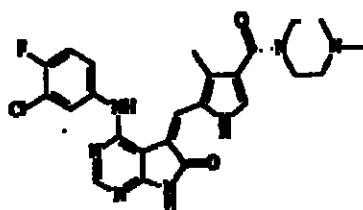
26



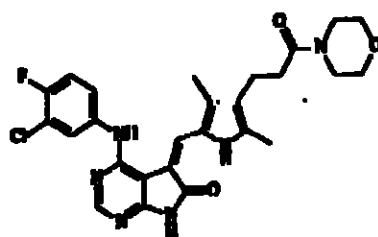
27



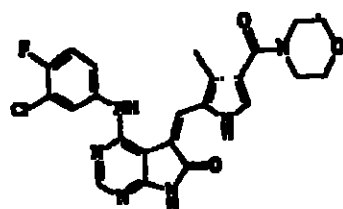
28



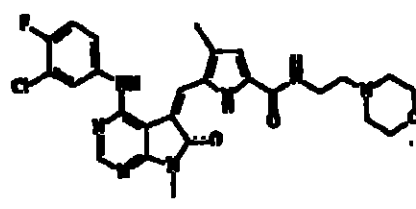
29



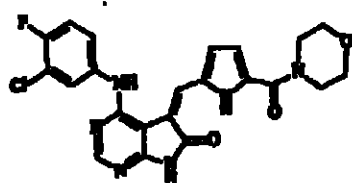
30



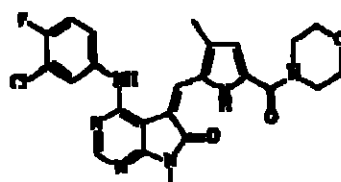
31



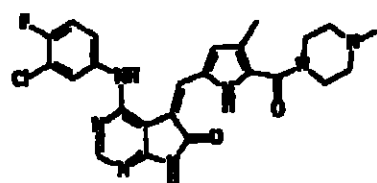
32



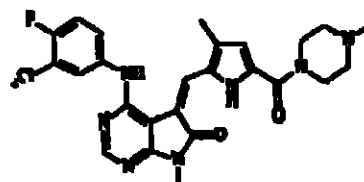
33



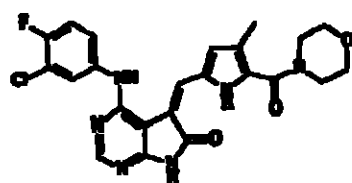
34



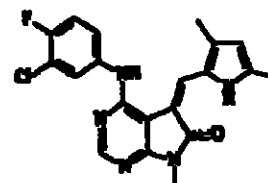
35



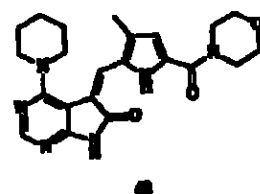
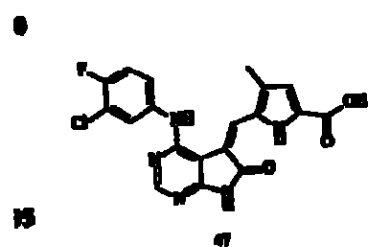
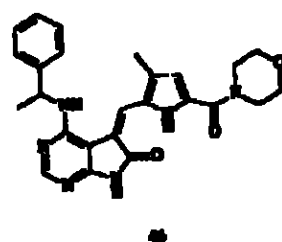
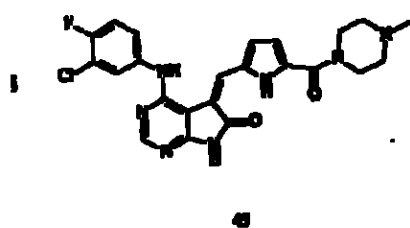
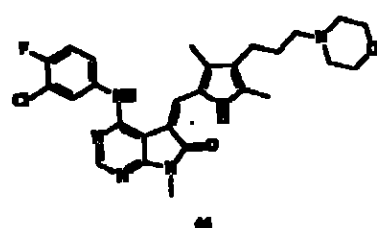
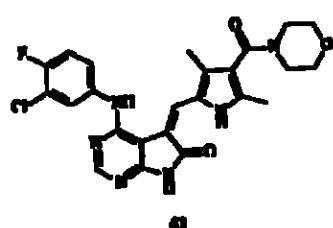
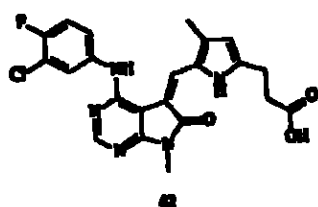
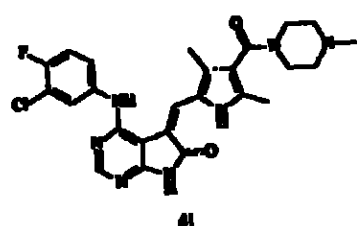
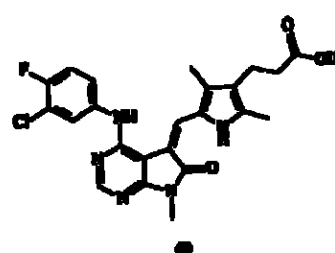
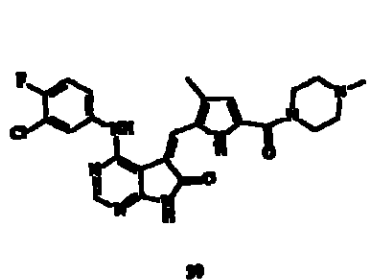
36

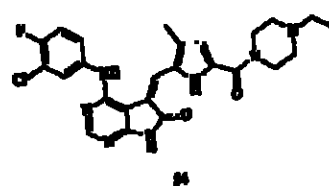
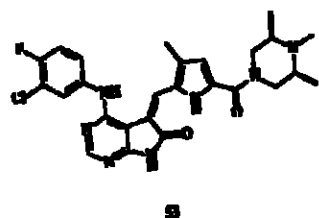
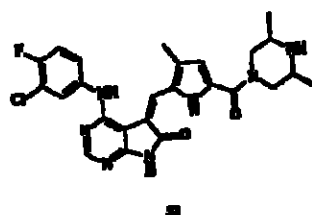
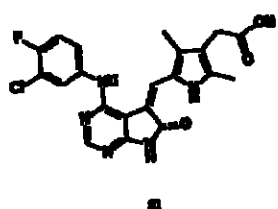
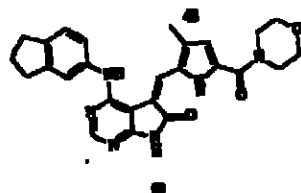
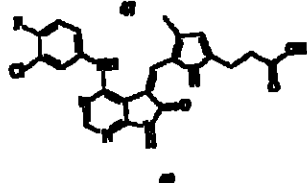
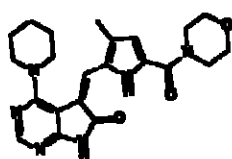
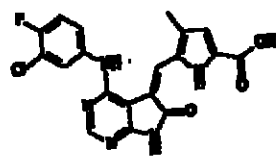
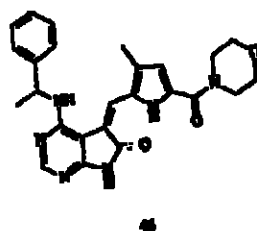
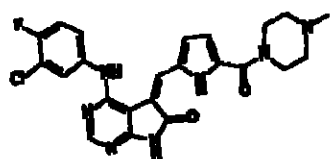
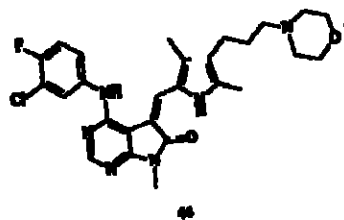
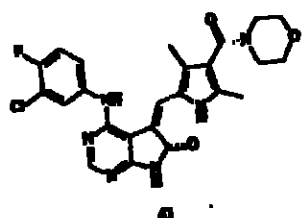


37



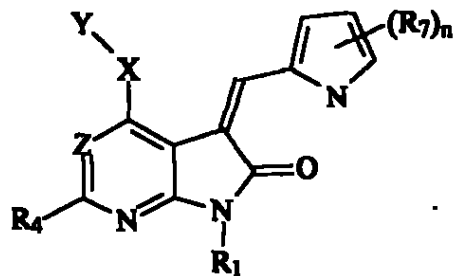
38



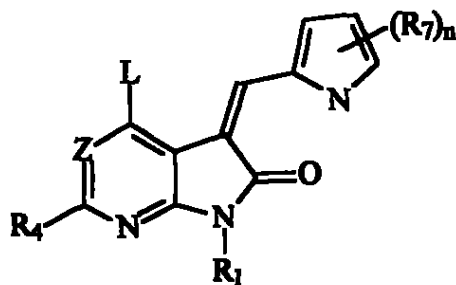


y sales aceptables para uso farmacéuticos, solvatos, clatratos, y prodrogas de los mismos. Las sales aceptable para uso farmacéuticos preferidas de los compuestos de la invención son sales clorhidrato.

Una segunda forma de realización de la invención abarca un método para preparar un compuesto de la fórmula 2:



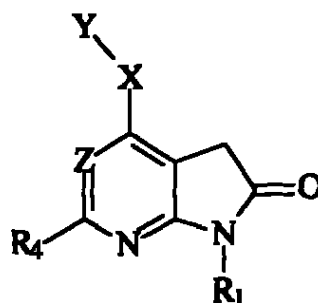
donde X, Y, Z, R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>, y n se definieron arriba, que incluye hacer reaccionar un compuesto de la fórmula:



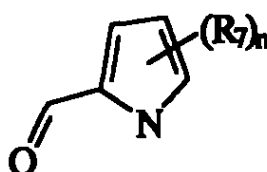
donde L es un grupo saliente con un compuesto de la fórmula YXH bajo las condiciones necesarias para formar un compuesto de la fórmula 2. Los grupos salientes preferidos incluyen, por ejemplo, Br, Cl, SCH<sub>3</sub>, y S(O)CH<sub>3</sub>. En un método preferido de esta forma de realización, la reacción se lleva a cabo en un solvente. Los solventes preferidos son polares. Los solventes más

preferidos incluyen, por ejemplo, alcoholes, DMF, DMSO, y mezclas de los mismos. En otro método preferido de esta forma de realización, la reacción es catalizada por un catalizador como, por ejemplo, AgOTf, Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, y *p*-TsOH.

Una tercera forma de realización de la invención abarca un método para preparar un compuesto de la fórmula 2 que incluye hacer reaccionar un compuesto de la fórmula:



con un compuesto de la fórmula:



bajo las condiciones necesarias para formar un compuesto de la fórmula 2. En un método preferido de esta forma de realización, la reacción se lleva a cabo en un solvente. Los solventes preferidos son polares. Los solventes más preferidos incluyen, por ejemplo, alcoholes, DMF, DMSO, y mezclas de los mismos. En otro método preferido de esta forma de realización, la reacción es catalizada por una base. Las bases preferidas incluyen, por ejemplo, piridina y piperidina.

Una cuarta forma de realización de la invención abarca una composición farmacéutica que incluye un compuesto de la fórmula 1, o una sal aceptable para uso farmacéutico, solvato, clatrato, o prodroga de los mismos, y un vehículo aceptable para uso farmacéutico. Además, esta forma de realización abarca formas de dosificación apropiadas para administración oral, transdérmica, tópica, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intratecal, intramuscular, e intravenosa), o mucosa (por ejemplo, rectal, vaginal, y nasal). Por lo tanto, aquí se contemplan formulaciones sólidas, liofilizadas, inyectables y transdérmicas tópicas.

Una quinta forma de realización de la invención abarca un método para regular, modular, o inhibir la actividad de proteína quinasa que incluye poner en contacto un compuesto de la fórmula 1, o una sal aceptable para uso farmacéutico o solvato de los mismos, con una proteína quinasa. En un método preferido de esta forma de realización, la proteína quinasa es una proteína tirosina quinasa. Preferiblemente el contacto se lleva a cabo, en un cultivo celular (*in vitro*) o en un humano, animal o pájaro (*in vivo*).

En otro método preferido de esta forma de realización, la proteína quinasa se selecciona entre el grupo que consiste en ab1, ATK, bcr-ab1, Blk, Brk, Btk, c-fms, c-kit, c-met, c-src, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, cRaf1, CSF1R, CSK, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, ERK, Fak, fes, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR5, Fgr, FLK-4, flt-1, Fps, Frk, Fyn, GSK, Gst-Flk1, Hck, Her-2, Her-4, IGF-1R, INS-R, Jak, JNK, KDR, Lck, Menten, MEK, p38, PANHER, PDGFR, PLK, PKC, PYK2, Raf, Rho, ros, SRC, tie1, tie2, TRK, UL97, VEGFR, Yes, y Zap70.

En un método más preferido de esta forma de realización, la proteína quinasa se selecciona entre el grupo que consiste en PANHER, EGFR, Her-2, Her-4, PDGFR, SRC, Lck, cdk2, p38, Raf, y Rho.

En un método aún más preferido de esta forma de realización, la proteína quinasa se selecciona entre el grupo que consiste en PANHER, CDK2, PDGFR, p38, y Raf.

Una sexta forma de realización de la invención abarca un método de tratar o impedir a enfermedad que se caracteriza por actividad de proteína quinasa no regulada que incluye administrar a un paciente (por ejemplo, un mamífero, preferiblemente un humano) que necesita ese tratamiento o prevención una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un compuesto de la fórmula 1, o una sal aceptable para uso farmacéutico, solvato, clatrato, o prodroga de los mismos.

En un método preferido de esta forma de realización, la enfermedad que se caracteriza por actividad de proteína quinasa no regulada se selecciona entre el grupo que consiste en: desórdenes proliferativos de los vasos sanguíneos tales como, por ejemplo, artritis y restenosis; desórdenes fibróticos tales como, por ejemplo, cirrosis hepática y aterosclerosis; desórdenes proliferativos celulares mesangiales tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica, rechazo de transplante de órganos, y glomerulopatías; desórdenes metabólicos tales como, por ejemplo, psoriasis, diabetes mellitus, heridas crónicas, inflamación, y enfermedades neurodegenerativas; enfermedades auto-inmunes; alergias; asma; trombosis; enfermedades del sistema nervioso; y cáncer.

En un método más preferido de esta forma de realización, la enfermedad que se caracteriza por actividad de proteína quinasa no regulada es cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, por ejemplo, cáncer de mamas, estómago, ovario, colon, pulmón (incluyendo célula no-pequeñas), cerebro, laringe, sistema linfático, tracto genitourinario (incluyendo vejiga y próstata), de ovarios, gástrico, hueso, y pancreático.

### **3.1. DEFINICIONES**

Según se usa aquí, el término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo, y yodo.

Según se usa aquí, el término "alquilo" incluye radicales hidrocarburo saturado monovalentes con unidades lineales, cíclicas, o ramificadas, y combinaciones de las mismos.

Según se usa aquí, el término "alquénilo" incluye radicales hidrocarburo monovalentes con unidades lineales, cíclicas, o ramificadas, y combinaciones de los mismos que comprenden por lo menos una unión doble carbono-carbono.

Según se usa aquí, el término "alquínilo" incluye radicales hidrocarburo saturados monovalentes con unidades lineales, cíclicas, o ramificadas, y combinaciones de los mismos que comprenden por lo menos una unión triple carbono-carbono.

Según se usa aquí para describir un compuesto o unidad, el término "derivado" significa un compuesto o unidad donde se ha cambiado el grado de saturación de por lo menos una unión (por ejemplo, una unión simple se ha cambiado a una unión doble o triple) o donde por lo menos un átomo de hidrógeno se ha reemplazado con un átomo diferente o una unidad química.

Los ejemplos de átomos diferentes y unidades químicas incluyen, por ejemplo, halógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, oxhidrilo, metoxi, alquilo, amina, amida, cetona, y aldehído.

Según se usa aquí para describir un compuesto o unidad, el término "sustituido" significa un compuesto o unidad donde por lo menos un átomo de hidrógeno se ha reemplazado con un átomo diferente o una unidad química. Los ejemplos de átomos diferentes y unidades químicas incluyen, por ejemplo, halógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, oxhidrilo, metoxi, alquilo, amina, amida, cetona, y aldehído.

Según se usa aquí, el término "heteroátomo" significa un átomo seleccionado de entre el grupo que consiste en O, S, y N.

Según se usa aquí, el término "metilindeno" significa una unión doble carbono-carbono opcionalmente sustituida.

Según se usa aquí, el término "prodroga" significa un derivado de un compuesto que se puede hidrolizar, oxidar, o reaccionar de otra forma bajo condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar el compuesto. Los ejemplos de prodrogas incluyen, por ejemplo, derivados de los compuestos de fórmula 1 que comprenden unidades biohidrolizables tales como amidas, ésteres, carbamatos, carbonatos, o ureidos. Dichas unidades biohidrolizables pueden estar ligadas, por ejemplo, a un péptido.

Según se usa aquí, el términos "carbamato biohidrolizable," "carbonato biohidrolizable" y "ureido biohidrolizable" significa un carbamato, carbonato, o ureido, respectivamente, de un compuesto que ya sea: 1) no interfiere con la actividad biológica del compuesto pero puede conferir propiedades *in vivo* ventajosas a ese compuesto, tales como absorción, duración de acción, o inicio

de la acción; o 2) es biológicamente inactivo pero se convierte *in vivo* al compuesto biológicamente activo. Los ejemplos de carbamatos biohidrolizables incluyen, por ejemplo, alquilaminas inferiores, etilenodiaminas sustituidas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas y heteroaromáticas, y poliéter aminas.

Según se usa aquí, el término "éster biohidrolizable" significa un éster de un compuesto que ya sea: 1) no interfiere con la actividad biológica del compuesto pero puede conferir propiedades *in vivo* ventajosas a ese compuesto, tales como absorción, duración de acción, o inicio de la acción; o 2) es biológicamente inactivo pero se convierte *in vivo* al compuesto biológicamente activo. Los ejemplos de ésteres biohidrolizables incluyen, por ejemplo, alquil ésteres inferiores, alcoxiaciloxi ésteres, alquil acilamino alquil ésteres, y ésteres de colina.

Según se usa aquí, el término "amida biohidrolizable" significa una amida de un compuesto que ya sea: 1) no interfiere con la actividad biológica del compuesto pero puede conferir propiedades *in vivo* ventajosas a ese compuesto, tales como absorción, duración de acción, o inicio de la acción; o 2) es biológicamente inactiva pero se convierte *in vivo* al compuesto biológicamente activo. Los ejemplos de amidas biohidrolizables incluyen, por ejemplo, alquil amidas inferiores, amidas de  $\alpha$ -amino ácido, alcoxdacil amidas, y alquilaminoalquilcarbonil amidas.

Según se usa aquí, el término "enfermedad que se caracteriza por actividad de proteína quinasa no regulada" significa a enfermedad o condición causada o agravada por actividad quinasa anormal. Los ejemplos de dichas enfermedades o condiciones incluyen, por ejemplo, proliferación celular

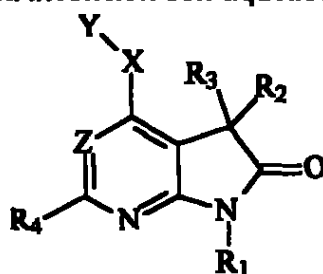
descontrolada (por ejemplo, crecimiento de tumor maligno) o a deficiencias en procesos clave relacionados con el desarrollo. Los ejemplos específicos incluyen, por ejemplo, desórdenes del sistema nervioso central, desórdenes inflamatorios, enfermedades del hueso, aterosclerosis, restenosis, trombosis, desórdenes metabólicos, y enfermedades infecciosas.

Según se usa aquí, el término "tratar" incluye el mejoramiento, reducción, o erradicación de los síntomas de la enfermedad.

#### **4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención abarca compuestos que afectan la actividad de una o más proteína quinasas. La invención además abarca compuestos que son útiles en métodos para regular, modular, y/o inhibir proteína quinasas tanto de los tipos receptor como no-receptor. La invención además proporciona métodos para tratar e impedir enfermedades y desórdenes que se relacionan con la actividad de proteína quinasa no regulada en pájaros y animales, y en particular en mamíferos tales como humanos.

Los compuestos de la invención son aquellos de la fórmula 1



y sales aceptable para uso farmacéuticos, solvatos, clatratos, y prodrogas de los mismos, donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, X, Y, y Z se definen aquí. Se debería apreciar que ciertos compuestos de la invención pueden tener uno o más centros o ejes quirales, así la invención además abarca racémicos y enantiómeros ópticamente puros de los compuestos de fórmula 1. La invención

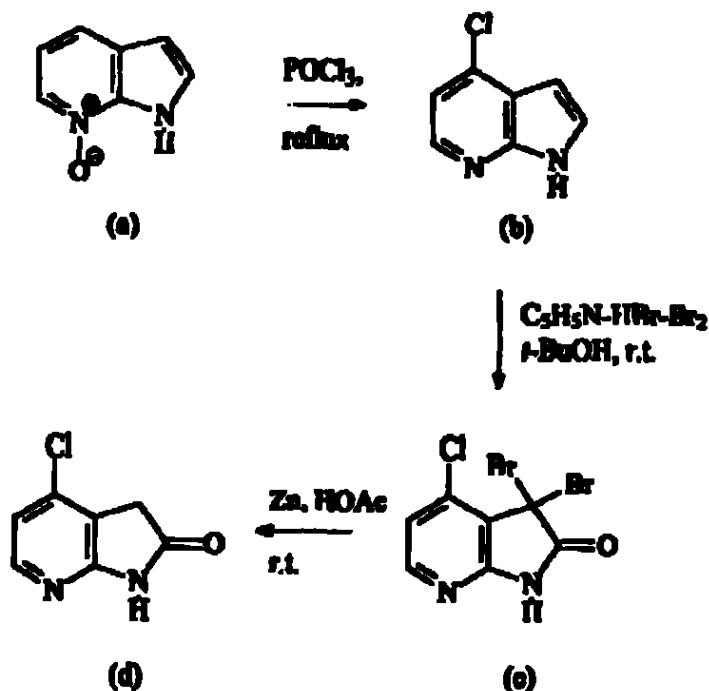
también abarca formas cristalinas y amorfas así como composiciones liofilizadas, no-liofilizadas, y estériles de los compuestos de fórmula 1.

Las sales aceptable para uso farmacéuticos de los compuestos de fórmula 1 incluyen sales de unidades ácidas o básicas. Los compuestos de la invención de naturaleza básica son capaces de formar una amplia variedad de sales con diferentes ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que se pueden usar para preparar sales de adición ácida aceptable para uso farmacéuticos de dichos compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición ácida no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, citrato ácido, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metansulfonato, etansulfonato, bencénosulfonato, p-toluénosulfonato, y pamoato [es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxí-3-naftoato)]. Los compuestos de la invención que comprenden una unidad básica, tal como un grupo amino, pueden formar sales aceptable para uso farmacéuticos con diferentes amino ácidos además de los ácidos mencionados arriba.

Los compuestos de la invención que son de naturaleza ácida son capaces de formar sales de adición básica con diferentes cationes farmacológicamente aceptables. Los ejemplos de dichas sales incluyen, por ejemplo, las sales de metales alcalinos o metales alcalino térreos, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, sodio, y potasio.

#### **4.1. SÍNTESIS**

Se pueden preparar fácilmente los compuestos de la invención a partir de 4-cloro-1,3-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-2-ona o 4-cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidina-6-ona u otro material de partida comercialmente o fácilmente accesible. Un método preferido para preparar 4-cloro-1,3-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-2-ona se muestra en el Esquema 1:

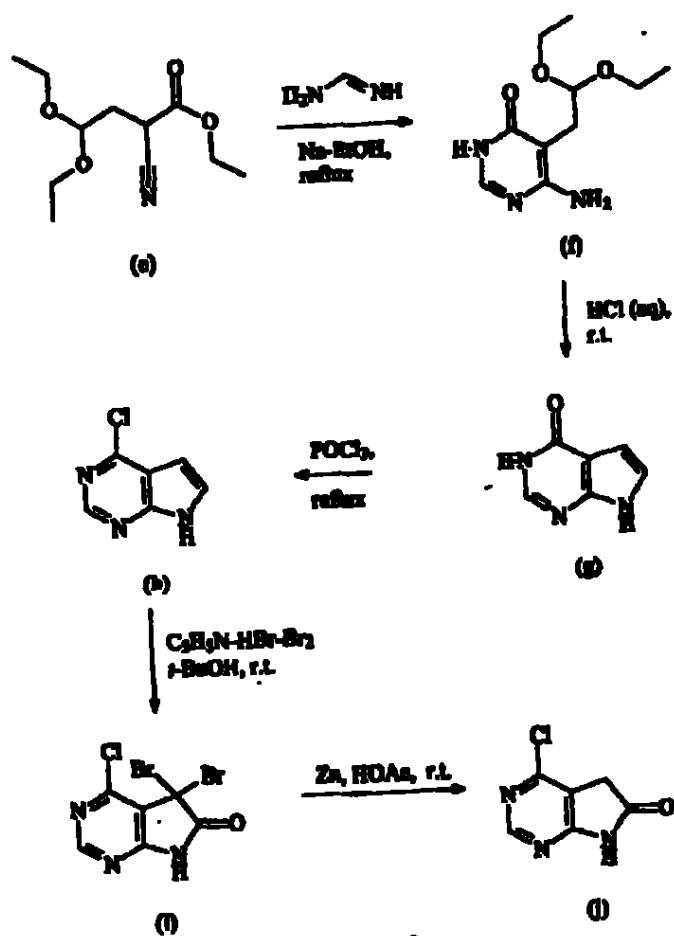


Scheme 1

De acuerdo con el Esquema 1, se clora el compuesto (a) para proporcionar el compuesto (b). Aunque para clorar el compuesto (a) se pueden usar una variedad de condiciones de reacción conocidas para aquellos experimentados en el arte, se prefiere el uso de  $\text{POCl}_3$ . Luego el compuesto (b) se convierte al compuesto (c) usando  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N-HBr-Br}_2$  en *t*-butanol. Preferiblemente esta reacción se hace a temperatura ambiente durante

aproximadamente cuatro horas, aunque aquellos experimentados en el arte reconocerán que se pueden variar el solvente y la temperatura y el tiempo de reacción para maximizar el rendimiento de compuesto (c). Finalmente, se forma la 4-cloro-1,3-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-2-ona (compuesto (d)) sustituyendo con átomos de hidrógeno a los átomos de bromo unidos al compuesto (c). Esto se consigue fácilmente usando zinc en ácido acético, aunque también se pueden usar otros métodos conocidos por aquellos experimentados en el arte.

En el Esquema 2 se describe un método preferido para preparar 4-cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidina-6-ona:

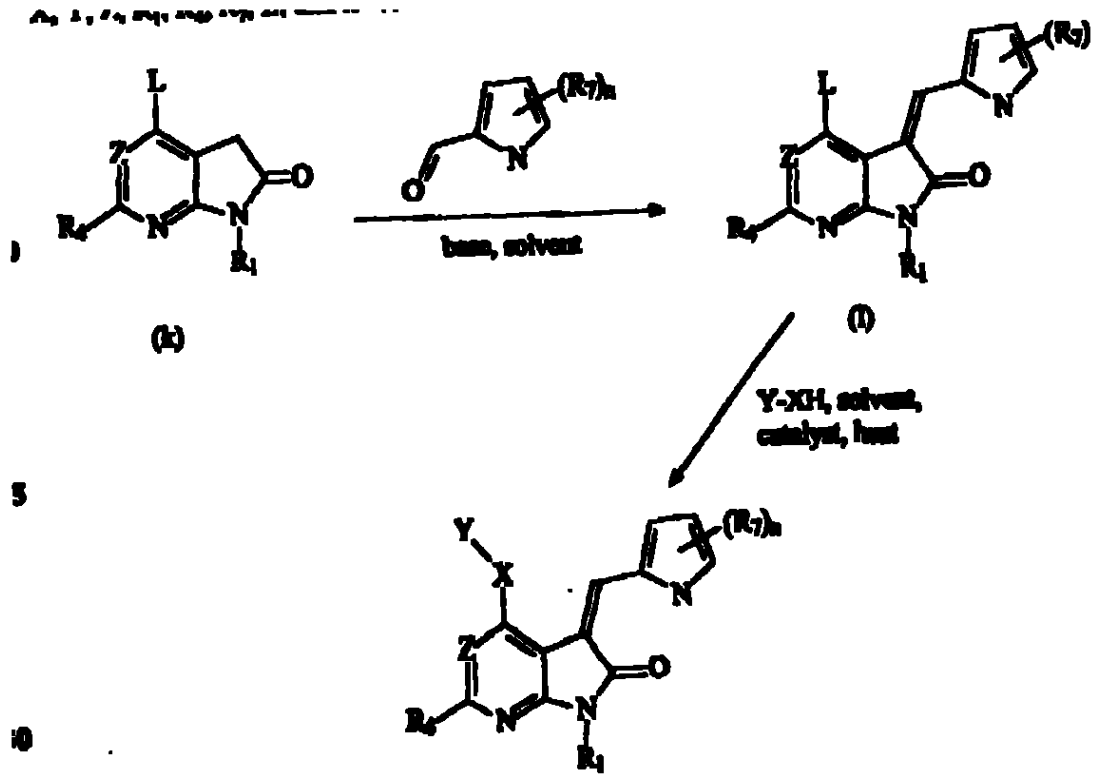


Scheme 2

De acuerdo con el Esquema 2, se hace reaccionar el compuesto (e) con clorhidrato de formamidina bajo condiciones básicas para proporcionar el compuesto (f). Luego se cicliza el compuesto (f) bajo condiciones ácidas, preferiblemente usando  $\text{HCl}$  acuoso 1N, para proporcionar el compuesto (g). Inmediatamente se reemplaza la parte ceto del compuesto (g) con un cloro

usando, por ejemplo,  $\text{POCl}_3$ . Luego se convierte el compuesto resultante (h) al compuesto (i) usando  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N-HBr-Br}_2$  en *t*-butanol. Esta reacción se hace preferiblemente a temperatura ambiente durante aproximadamente cuatro horas, aunque aquellos experimentados en el arte reconocerán que se pueden variar el solvente y la temperatura y el tiempo de reacción para maximizar el rendimiento de compuesto (i). Finalmente, se forma la 4-cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidina-6-ona (compuesto (j)) sustituyendo los átomos de bromo unidos al compuesto (i) con átomos de hidrógeno. Esto se consigue fácilmente usando zinc en ácido acético, aunque también se pueden usar otros métodos conocidos por aquellos experimentados en el arte.

Los compuestos de la invención se preparan fácilmente a partir de 4-cloro-1,3-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-2-ona y 4-cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidina-6-ona. Un método preferido se muestra en el Esquema 3, donde cada una de X, Y, Z,  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_7$ , L, y n se definen aquí:

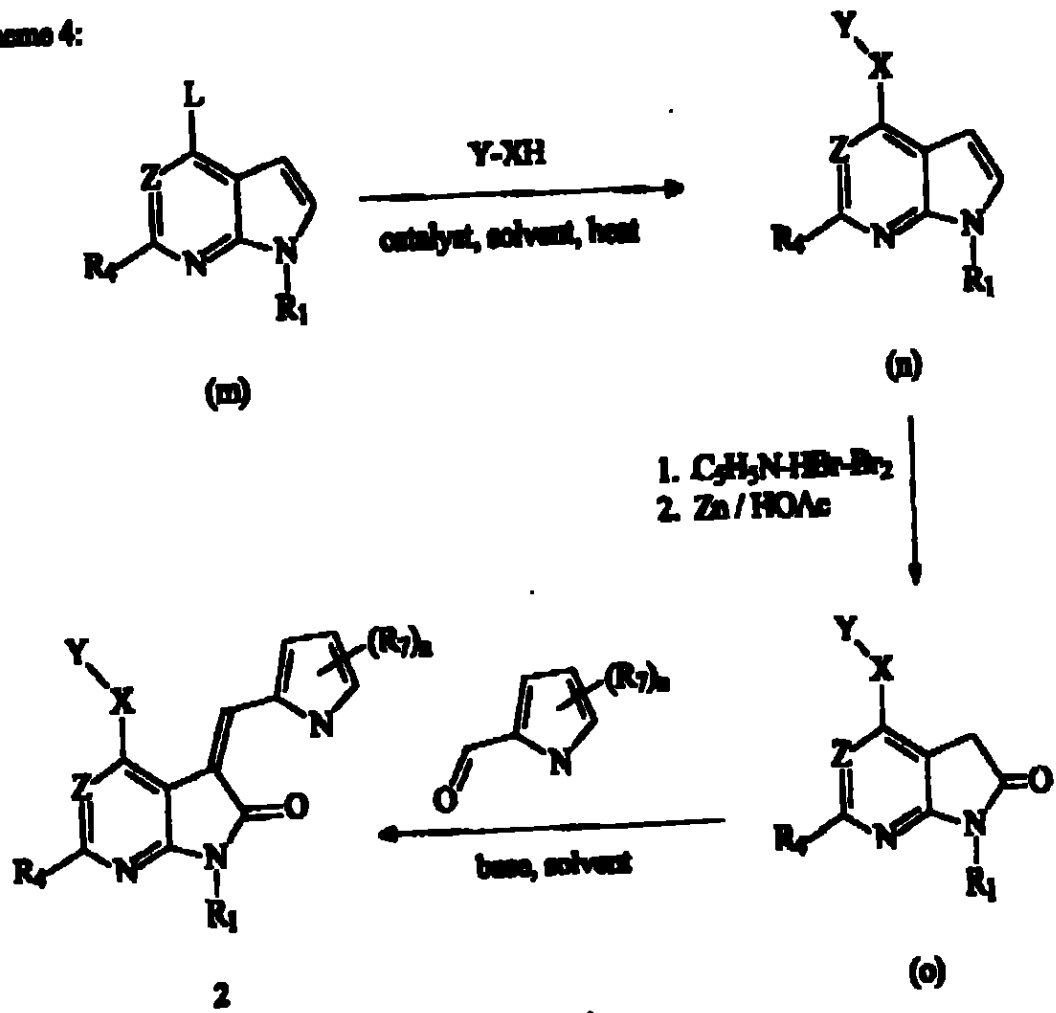


2  
Scheme 3

De acuerdo con el Esquema 3, se acopla el material de partida (k) con un derivado de pirrol bajo condiciones de reacción apropiadas para rendir el compuesto (l). Luego se reemplaza el grupo saliente L con la unidad XY para proporcionar el compuesto 2.

Otro método preferido para preparar compuestos de la invención se muestra en el Esquema 4:

cheme 4:



Scheme 4

De acuerdo con el Esquema 4, se acopla el compuesto (m) con XY para formar el compuesto (n). Luego se convierte el compuesto (n) al compuesto (o) usando  $C_5H_5N-HBr-Br_2$  en *t*-butanol. Preferiblemente, esta reacción se hace a temperatura ambiente durante aproximadamente cuatro horas, aunque aquellos experimentados en el arte reconocerán que se pueden variar el solvente y la temperatura y el tiempo de reacción para maximizar el rendimiento de compuesto (o). Finalmente, se acopla el compuesto (o) con un derivado de pirrol bajo condiciones de reacción apropiadas para rendir el compuesto 2.

#### 4.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Se puede determinar fácilmente la capacidad de un compuesto de la invención para afectar la actividad de una proteína quinasa usando métodos bien conocidos por aquellos experimentados en el arte. Por ejemplo, se puede poner en contacto un compuesto (*in vitro* o *in vivo*) con células que expresan una quinasa de interés, luego de lo cual: (a) se pueden estimar los cambios fenotípicos en el cultivo celular en comparación con unas células de control que no fueron expuestas al compuesto; o (b) se pueden preparar lisados de células para evaluar las proteínas fosforiladas.

Este último enfoque está ilustrado por varias metodologías. Una técnica común involucra la incubación células con un ligando y fosfato radioactivo, lisando las células, separando los componentes celulares usando una técnica en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), ya sea en una o dos dimensiones, y luego detectando la presencia de proteínas fosforiladas por exposición sobre película de rayos X. Una técnica similar involucra la separación de

componentes celulares usando SDS-PAGE, la transferencia de los componentes separados a un sustrato sólido como una hoja de nitrocelulosa, y luego detectando la presencia de tirosinas fosforiladas usando un anticuerpo antifosfotirosina (anti-PY). El anti-PY se puede detectar por marcándolo con una sustancia radioactiva, que luego requiere la exploración de la nitrocelulosa marcada con un equipo especializado diseñado para detectar radioactividad o exposición de Película de rayos X. Alternativamente, se puede marcar el anti-PY con una enzima, como peroxidasa de rábano picante, y detectado mediante la subsecuente adición de un sustrato colorimétrico para la enzima. Una alternativa adicional involucra la detección del anti-PY haciéndolo reaccionar con un segundo anticuerpo que reconoce el anti-PY y que se marca ya sea con una unidad radioactiva o una enzima como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de dichas técnicas y otras similares se describen en Hansen *et al.*, *Electrophoresis* 14:112-126 (1993); Campbell *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:7427-7434 (1993); Donato *et al.*, *Cell Growth and Diff.* 3:258-268 (1992); y Katagiri *et al.*, *J. Immunol.* 150:585-593 (1993).

Otros, ensayos del tipo del ELISA, que se pueden usar para determinar la actividad biológica de un compuesto de la invención se revelan en Peraldi *et al.*, *J. Biochem.* 265:71-76 (1992); Schraag *et al.*, *Analytical Biochemistry* 211:233-239 (1993); Cleavland, *Analytical Biochemistry* 190:249-253 (1990); Farley, *Analytical Biochemistry* 203:151-157 (1992); y Lázaro, *Analytical Biochemistry* 192:257-261 (1991).

Un método preferido para determinar la capacidad de un compuesto de la invención para afectar la actividad de proteína quinasa se revela en la Solicitud de Patente de los EEUU N° 08/234,440, que se incorpora aquí como

referencia. De acuerdo con este método, se expone una célula objetivo que expresa una quinasa y que se fosforila o defosforila durante la transducción de la señal a un compuesto de la invención. De allí en adelante, se lisa la célula objetivo para liberar los contenidos celulares, que incluyen el sustrato de proteína. Se aísla el sustrato poniendo en contacto el lisado de células con a un anticuerpo específico para ese sustrato inmovilizado sobre un soporte sólido y subsecuentemente se lavan los otros componentes celulares. Se lleva a cabo un inmunoensayo sobre el sustrato aislado para detectar la presencia o ausencia de residuos fosfotirosina sobre el sustrato, en comparación con unos lisados de control de células objetivo que no fueron expuestas al compuesto de interés. En los Ejemplos 20–24 se describen otros métodos preferidos para medir los efectos biológicos de compuestos de la invención.

#### **4.3. COMPOSICIONES FARMACEUTICAS Y METODOS DE TRATAMIENTO**

Los compuestos de la invención (en adelante denominados "ingredientes activos") pueden usarse para regular, moderar o inhibir la actividad cinasa de la proteína. Pueden usarse así en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos en pájaros y animales. Los pacientes preferidos son los mamíferos y en particular los humanos. Los ejemplos de enfermedades y trastornos que pueden tratarse o prevenirse con métodos de la invención incluyen, entre otros, trastornos proliferativos de los vasos sanguíneos tales como artritis y estenosis, pero sin limitarse a ellos, trastornos fibróticos tales como cirrosis hepática y arteriosclerosis, entre otros, trastornos proliferativos de las células mesangiales tales como glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica, rechazo de trasplante de órganos y glomerulopatías, entre otros, trastornos metabólicos tales como, psoriasis, diabetes mellitus, lesiones crónicas, inflamación y enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, alergias, asma, trombosis, enfermedades del sistema nervioso y cáncer. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, el de mamas, de estómago, ovario, colon, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas), cerebro, laringe, sistema linfático, tracto genito-urinario (incluye vejiga y próstata), ovárico, gástrico, de huesos y cáncer de páncreas.

##### **4.3.1. VIAS DE ADMINISTRACION Y FORMA DE DOSIFICACION**

Los compuestos de la invención pueden suministrarse al paciente por cualquier vía adecuada, lo que incluye, entre otras la vía oral, transdérmica, tópica o parenteral (por ejemplo, subcutánea, intratecal, intramuscular y endovenosa) y por las mucosas (por ejemplo, rectal, vaginal y nasal). Las

formas de dosificación abarcadas por el invento incluyen, entre otras, tabletas, capsulitas, cápsulas, pastillas, sustancias dispersas, suspensiones, supositorios, soluciones, cremas, apósitos, soluciones, sólidos liofilizados apropiados para reconstitución en soluciones y aerosoles (por ejemplo, en forma de mini-bombas).

Un compuesto de la invención puede administrarse en forma local en vez de en forma general, por ejemplo, mediante inyección del compuesto directamente en un tumor sólido, a menudo en un depósito o en una formulación de liberación sostenida. Un compuesto también puede ser administrado en un sistema de administración de drogas direccionado, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico del tumor. El liposoma será direccionado al tumor y será absorbido por el mismo en forma selectiva.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden producirse de una manera muy conocida para los profesionales de la actividad, por ejemplo, por medio de mezclas convencionales o procesos de disolución, granulación, preparación de grageas, pulverización, emulsificación, encapsulado, aprisionamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de esta manera usando uno o más transportadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los componentes activos en preparaciones aceptables a los fines farmacéuticos. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para la inyección, un ingrediente activo en una solución acuosa, preferentemente en un buffer compatible fisiológicamente, tal como la solución

de Hanks, la solución de Ringer o un buffer fisiológico salino. Para la administración a través de las mucosas, se usan en la formulación los penetrantes apropiados para la barrera que debe penetrarse. Dichos penetrantes son ampliamente conocidos en la profesión.

Para la administración por vía oral, se puede combinar un ingrediente activo con uno o más de los muchos transportadores aceptables a los fines farmacéuticos, ya conocidos en la profesión. Dichos transportadores permiten que los compuestos de la invención se formulen por ejemplo, como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pasta aguada y suspensiones para ingestión por vía oral por parte del paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse por medio de la mezcla de un compuesto de la invención con un excipiente sólido, moliendo en forma opcional la mezcla resultante, procesando la mezcla hasta obtener gránulos y agregando los auxiliares opcionales adecuados para obtener la parte central de las tabletas o grageas. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, rellenos tales como azúcares, lo que incluye lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones celulares tales como por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma tragacanto, celulosa de metilo, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona de enlace cruzado, agar o ácido algínico o una sal del mismo, como el alginato de sodio.

Las partes centrales de las grageas, que pueden ser libres de lactosa, se recubren en forma apropiada para proveer las tabletas de la invención. Para este propósito, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar que

pueden contener, opcionalmente, goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Se pueden agregar materias colorantes o pigmentos a las cubiertas de las tabletas o grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden suministrarse por vía oral incluyen cápsulas apropiadas para introducir hechas de gelatina, así como también cápsulas selladas suaves hechas de gelatina y un plastificante como glicerol o sorbitol. Las cápsulas para introducir pueden contener un ingrediente activo mezclado con rellenos tales como lactosa, sustancias aglutinantes, como almidones y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas suaves, el compuesto activo puede disolverse o suspenderse en cualquier líquido adecuado, tal como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido. También se pueden agregar estabilizadores. Todas las formulaciones para la administración por vía oral deben ser en dosis adecuadas para dicha administración.

Para la administración por boca, las formas de dosificación de la invención pueden tomar la forma de tabletas o lozenges formulados de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los ingredientes activos de la invención pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación en un spray aerosol de presentación presurizada o nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoretano o dióxido de carbono. En el caso

de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proveyendo una válvula que permita suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina que por ejemplo se usen en un inhalador o insuflador pueden formularse de manera que contengan una mezcla de polvos del compuesto y una base de polvo apropiada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos de la invención pueden formularse para la administración por vía parenteral por medio de inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o una infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de unidades dosificadas, por ejemplo, en ampollas o en envases para dosis múltiples con un conservante agregado. Las composiciones pueden tomar la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, de estabilización y/o de dispersión.

Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, se pueden preparar las suspensiones de compuestos activos como suspensiones de inyección oleosas adecuadas. Los solventes lipofílicos o vehículos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintético tales como el oleato etílico, o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextran. En forma opcional, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que incrementen la solubilidad de los compuestos que permiten la preparación de

**soluciones altamente concentradas.**

**Los ingredientes activos de la invención pueden ser en forma de polvo para su constitución con un vehículo apropiado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de usar.**

**Los compuestos de la invención también pueden formularse en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención que contengan por ejemplo, las bases convencionales para supositorios tales como manteca de cacao y otros glicéridos. Los compuestos que se dan a conocer en la presente pueden además formularse como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de larga duración pueden suministrarse por implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo, se puede formular un ingrediente activo con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o con resinas de intercambio de iones o como un derivado soluble económico, por ejemplo como una sal apenas soluble.**

**Uno de los transportadores farmacéuticos preferidos para los compuestos de la invención que son hidrófobos es un sistema de cosolventes que comprende el alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico que se puede mezclar con agua y una fase acuosa. El sistema de cosolvente puede ser el sistema de cosolvente VPD. VPD es una solución de 3% peso/volumen de alcohol bencílico, 8% p/v del polisorbato 80 tensioactivo no polar y 65% p/v polietilenglicol 300, completado hasta alcanzar el volumen en etanol absoluto. El sistema de cosolventes VPD (VPD:D5W) está formado por VPD diluido 1:1 con dextrosa 5% en una solución de agua. Este sistema de cosolvente disuelve bien los compuestos hidrófobos, y produce baja**

toxicidad cuando se lo suministra en forma general. Naturalmente, se pueden variar considerablemente las proporciones del sistema de cosolventes sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Adicionalmente, se puede variar la identidad de los componentes del cosolvente; por ejemplo, se pueden usar otros tensioactivos no polares de baja toxicidad en lugar del polisorbato 80, se puede variar la medida de fracción del polietilenglicol y otros polímeros compatibles biológicamente pueden reemplazar al polietilenglicol, por ejemplo la polivinilpirrolidona y otros azúcares o polisacáridos pueden substituir a la dextrosa.

Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de suministro de compuestos farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración o transportadores de drogas hidrófobas. También pueden emplearse algunos solventes orgánicos tales como el sulfoxido de dimetilo, a pesar de que habitualmente a expensas de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos de la invención pueden suministrarse usando un sistema de liberación prolongada, tales como matrices semi-permeables de polímeros sólidos hidrófobos que contienen el agente terapéutico. Una gran variedad de materiales de liberación prolongada son bien conocidos por los profesionales del sector. Las cápsulas de liberación prolongada, dependiendo de su naturaleza química, pueden liberar los compuestos por unas pocas semanas o hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender transportadores de fase o excipientes sólidos o en gel apropiados. Los

ejemplos de dichos transportadores o excipientes incluyen, entre otros, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatinas y polímeros tales como polietilenglicol.

Además de las formas de dosificación habituales mencionadas en el presente, los compuestos de la invención pueden suministrarse por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración que incluyen, entre otros bombas osmóticas Alzet® que se pueden obtener en Alza Corporation, Palo Alto, CA. En las patentes de los Estados Unidos Nro. 3.536.809, 3.598.123, 3.845.770, 3.916.899, 3.944.064 y 4.008.719 se describen dispositivos de administración adecuados, cuyas descripciones se incorporan a la presente como referencia.

Las composiciones de la invención, si se lo desea, pueden presentarse en un paquete o en un dispositivo surtidor que puede contener una o más formas de unidades de dosificación que contengan el ingrediente activo. Por ejemplo, el paquete puede estar hecho con hojas metálicas o plásticas tales como un paquete de blisters. El paquete o dispositivo de distribución puede estar acompañado con instrucciones para su administración. Las composiciones que contengan un compuesto de la invención formulado en un transportador farmacéuticamente compatible también pueden prepararse y colocarse en un recipiente apropiado, e identificarlas con etiquetas para el tratamiento de una enfermedad indicada. Las enfermedades correspondientes indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de un tumor tal como glioma o glioblastoma y la inhibición de angiogénesis.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para su uso en la invención incluyen composiciones en las cuales los ingredientes activos se

encuentran en cantidades eficaces para lograr el propósito deseado. La determinación de las cantidades eficaces se encuentra dentro de las habilidades de aquellos profesionales del sector, especialmente a la luz de la descripción detallada que se suministra en el presente

#### **4.3.2. DOSIFICACION**

Para cualquier compuesto usado en los métodos de la invención, se puede estimar inicialmente una dosis terapéutica o profiláctica eficaz de los ensayos de cultivos de células. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración en circulación que incluya el IC<sub>50</sub> como se determina en el cultivo de células (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de la actividad de la cinasa de la mitad de la máxima). Dicha información puede emplearse para determinar más exactamente las dosis útiles en humanos.

Una cantidad eficaz a los fines terapéuticos se refiere a la cantidad de un compuesto que logra una mejoría de los síntomas o la prolongación de la supervivencia de un paciente. Una cantidad eficaz a los fines profilácticos se refiere a la cantidad de un compuesto suficiente para prevenir o demorar el comienzo de una enfermedad o trastorno. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos de la invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos de células o animales experimentales en los que se determine la LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED<sub>50</sub> (la dosis eficaz a los fines terapéuticos en 50% de la población). El coeficiente de dosificación entre los efectos tóxicos y terapéuticos o profilácticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de LD<sub>50</sub> a ED<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que exhiben altos

**Indices terapéuticos.** Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos de células y estudios sobre animales pueden emplearse para formular un rango de dosis para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos reside preferentemente en un rango de concentraciones en circulación que incluye la ED<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración. El médico puede elegir la formulación exacta, la vía de administración y la dosificación en vista de las condiciones del paciente. Véase, por ejemplo, a <sup>1</sup> Finigl y otros, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 1 (1975).

La cantidad de las dosis y los intervalos pueden ajustarse individualmente para proveer niveles en plasma del ingrediente activo suficientes para mantener los efectos de moderación de la cinasa o la concentración mínima eficaz (MEC). La MEC variará para cada compuesto, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*; por ejemplo, que la concentración necesaria para lograr una inhibición de la cinasa está entre el 50-90% empleando los estudios descritos en el presente. Las dosis necesarias para lograr la MEC dependerá de las características individuales y de la vía de administración, pero pueden emplearse estudios de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) o estudios biológicos para determinar las concentraciones en plasma.

Los intervalos de las dosis pueden determinarse también usando el valor MEC. Los componentes deben administrarse usando un régimen que mantenga los niveles en plasma un 10-90% del tiempo sobre la MEC, preferentemente entre el 30-90% y mejor aún entre 50-90%.

Las dosis habituales para pacientes en los casos de administración en general varían entre 1 y 2000 mg por día, habitualmente entre 1 y 250 mg por día y típicamente entre 10 y 150 mg por día. Expresado en términos del peso corporal del paciente, las dosis usuales varían de 0,02 a 25 mg por kilo por día, habitualmente de 0,02 a 3 mg por kilo por día y típicamente de 0,2 a 1,5 mg por kilo por día. Expresado en términos del área de la superficie corporal del paciente las dosis habituales varían de 0,5 a 1200 mg por m<sup>2</sup> por día, habitualmente de 0,5 a 150 mg por m<sup>2</sup> por día y típicamente de 5 a 100 mg por m<sup>2</sup> por día. Los niveles en plasma promedio usuales deben mantenerse dentro de 50 a 5000  $\mu$ g/ml, habitualmente 50 a 1000  $\mu$ g/ml, y típicamente de 100 a 500  $\mu$ g/ml, a pesar de que en casos de administración local o captación selectiva la concentración local eficaz de la droga no puede relacionarse con la concentración en plasma. Tal como reconocen los profesionales del sector, sin embargo, estas dosis y niveles de plasma variarán de acuerdo con el paciente, la enfermedad tratada (por ejemplo, los distintos cánceres pueden requerir diferentes dosis), la vía de administración y el ingrediente activo empleado en particular. La dosis y quizás la frecuencia de la dosificación también variarán de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente en particular. Por lo tanto, se recomienda que los infantes, niños y pacientes mayores de 65 años y aquellos con las funciones renales o hepáticas disminuidas reciban inicialmente dosis bajas y que se los titule sobre la base de la respuesta clínica individual y niveles en sangre.

Los niveles convenientes en sangre se pueden mantener por la infusión constante del compuesto tal como lo determine los niveles en plasma medidos por HPLC. Debe destacarse que el médico interviniente deberá saber cómo y

cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a una dosificación menor debido a la toxicidad, o disfunciones de la médula ósea, hígado o riñón. El médico interviniente deberá saber también ajustar el tratamiento a niveles más elevados si la respuesta clínica no es adecuada (previniendo la toxicidad).

Otras ventajas de la invención podrán comprenderse a partir de los siguientes ejemplos no limitativos.

## **5. EJEMPLOS**

### **5.1. EJEMPLO 1**

#### **SÍNTESIS DE 4-CLORO-1,3-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*b*]PIRIDIN-2-ONA**

Se disolvió 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina 7-óxido (1.86 g, 13.9 mmol, literatura de referencia: *J. Org. Chem.* 45(20):4045-8 (1980)) en 10 mL de oxidocloruro de fósforo. La mezcla de la reacción se sometió a reflujo durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El residuo se extrajo con acetato de etilo/agua. La capa orgánica se lavó con salmuera a pH 6, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró y se secó en un horno de vacío durante toda la noche para proporcionar 0.88 g (42%) de 4-cloro-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina como un sólido tostado.

<sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.99 (s, br, 1H, NH), 8.16 (d, *J* = 5.15 Hz, 1H), 7.57 (t, br, *J* = 3.38 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 5.15 Hz, 1H), 6.49 (dd, *J* = 1.80, 3.38 Hz, 1H).

MS *m/e* 153 [M<sup>+</sup>].

A una solución agitada de 4-cloro-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (0.4 g, 2.6 mmol) en *t*-butanol (25 mL) se agregó perbromuro de bromuro de piridinio (PBPB, 2.5 g, 7.8 mmol) por porciones. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se agregó otros 0.39 g (3.1 mmol) de

PBPB. La mezcla resultante de la reacción se continuó agitando durante 1 hora y se extrajo con acetato de etilo/agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró. La trituración del producto crudo con diclorometano proporcionó 0.733 g (88%) de 3,3-dibromo-4-cloro-1,3-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-2-ona como un sólido tostado.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.23 (s, br, NH), 8.20 (d,  $J$  = 5.66 Hz, 1H), y 7.30 (d,  $J$  = 5.66 Hz, 1H). MS  $m/e$  326 [ $\text{M}^+$ ].

Una mezcla de 3,3-dibromo-4-cloro-1,3-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-2-ona (0.745 g, 2.3 mmol), polvo de zinc (1.49 g, 23 mmol), ácido acético (10 mL) y metanol (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de la reacción se diluyó a continuación con salmuera y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó nuevamente con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró y se secó en un horno de vacío para proporcionar 0.3 g (78%) de 4-cloro-1,3-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-2-ona como un sólido tostado.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.21 (s, br, NH), 8.01 (d,  $J$  = 5.66 Hz, 1H), 7.23 (d,  $J$  = 5.66 Hz, 1H), y 3.59 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ). MS  $m/e$  168 [ $\text{M}^+$ ].

## 5.2. EJEMPLO 2

### SÍNTESIS de 4-CLORO-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA

A una solución de 45.2 mmol de etóxido de sodio (preparado in situ a partir de sodio y etanol absoluto) en 40 mL de etanol absoluto se agregó clorhidrato de formamidina (1.74 g, 21.5 mmol) y etiléster de ácido 2-ciano-4,4-dietoxi-butírico (2.47 g, 11 mmol, literatura de referencia: Davoll, J., *J. Chem. Soc.* 131-138 (1960)). La mezcla se sometió a reflujo durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El sólido se lavó con acetonitrilo

caliente. El filtrado se neutralizó con ácido acético a pH 6.5 y a continuación se evaporó a la mitad del volumen. Se agregó acetato de etilo (50 mL) al filtrado resultante. El precipitado se filtró, se lavó con EtOAc para proporcionar 1.6 g (66%) de 6-amino-5-(2,2-dietoxi-etil)-3H-pirimidin-4-ona como un sólido blanco que se usó sin más purificación.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.46 (s, br, 1H, NH), 7.68 (s, 1H), 6.07 (s, br, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.54 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 3.53-5.62 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 3.31-3.49 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2.50 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), y 1.05 (t,  $J = 6.93$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

Se disolvió 6-amino-5-(2,2-dietoxi-etil)-3H-pirimidin-4-ona (150 mg, 0.7 mmol) en 5.0 mL de solución 1N de HCl. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y el precipitado se filtró, se lavó con una cantidad mínima de agua y se secó en un horno de vacío durante toda la noche para proporcionar 60 mg (64%) de 3,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-4-ona como un sólido blanco.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.63 (s, 1H, NH), 1.75 (s, 1H, NH), 7.80 (s, 1H), 7.01 (dd,  $J = 2.65, 3.21$  Hz, 1H), y 6.42 (dd,  $J = 2.09, 3.21$  Hz, 1H). MS  $m/e$  134  $[\text{M}+1]^+$ .

Se hizo reaccionar 3,7-Dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-4-ona (60 mg, 0.45 mmol) con 3.0 mL de oxidocloruro de fósforo para proporcionar 49 mg (70%) de 4-cloro-7H-pirrol[2,3-*d*]pirimidina como un sólido blancuzco.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.57 (s, br, 1H, NH), 8.58 (s, 1H), 7.68 (dd,  $J = 2.53, 3.36$  Hz, 1H), y 6.59 (dd,  $J = 1.86, 3.36$  Hz, 1H). MS  $m/e$  153  $[\text{M}-1]^+$ .

Se oxidó 4-Cloro-7H-pirrol[2,3-*d*]pirimidina (245 mg, 1.65 mmol) usando PBPB para proporcionar 230 mg (42%) de 5,5-dibromo-4-cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona como un sólido blanco. A continuación se

redujo usando polvo de zinc para proporcionar 80 mg (42%) de 4-cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]primidin-6-ona como un sólido ligeramente tostado.

### 5.3. EJEMPLO 3

#### **SÍNTESIS de 5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-2-OXO-1,2-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*B*]PIRIDIN-3-ILIDENMETIL]-4-METIL-1*H*-PIRROL-2-ÁCIDO CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 3)**

A 3 ml de (39.2 mmol) de *N,N*-dimetilformamida enfriada con hielo, se agregó dimetilformamida (DMF) oxiclورو de fósforo (0.67 mL, 7.18 mmol) por goteo y la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos. Se agregó a la reacción una solución de 1 g (6.53 mmol) de etiléster de ácido 4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico en 3 mL de DMF. Luego de 1 hora, la reacción se calentó a temperatura ambiente durante otras 2.5 horas. La mezcla de la reacción se diluyó con agua (100 mL) y se basificó a pH = 11 con solución 1N de hidróxido de sodio. El precipitado se separó por filtración, fenzuagando con agua y se secó para proporcionar 0.8 g (68%) de etiléster de ácido 5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.6 (br s, 1H, NH), 9.78 (s, 1H, CHO), 6.68 (s, 1H), 4.26 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). MS 181 [M<sup>+</sup>].

A una solución de 0.8 g etiléster de ácido (4.4 mmol) de 5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico en 35 mL de agua y 15 mL de etanol se agregó 0.5 g (8.9 mmol) de hidróxido de potasio. La mezcla de la reacción se calentó a 100 °C durante 1 hora, se enfrió a temperatura ambiente, y se evaporó el etanol. La capa acuosa se acidificó a pH = 3 usando solución 2N de cloruro de hidrógeno. El precipitado se filtró y se lavó con agua para

proporcionar 0.67 g (68%) de ácido 5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico como un sólido tostado.

$^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.92 (br s, 1H, CO<sub>2</sub>H), 12.48 (br s, 1H, NH), 9.76 (s, 1H, CHO-5), 6.63 (s, 1H), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS  $m/z$  152 [M-1].

A una suspensión de ácido 5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2 g, 13 mmol) en acetonitrilo se agregó 4-(2-aminoetil)morfolina (1.9 mL, 14 mmol), EDC (2.7 g, 14 mmol), HOBt (1.9 g, 14 mmol) y trietilamina (3.6 mL, 26 mmol) consecutivamente. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en 300 mL de solución 1N de cloruro de hidrógeno. La capa acuosa se lavó con 150 mL de acetato de etilo dos veces y se basificó con bicarbonato de sodio. A continuación se extrajo el producto con 250 mL de diclorometano dos veces, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y se concentró para proporcionar 1.8 g (53%) de ácido 5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida como un sólido amarillento.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.19 (br s, 1H, NH), 9.72 (s, 1H, CHO), 8.29 (br t,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, CONH), 6.65 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 3.5 (m, 4H), 3.3 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 2.4 (m, 6H), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS  $m/z$  285 [M<sup>+</sup>].

Una mezcla de la reacción de 4-cloro-1,3-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-2-ona (85 mg, 0.5 mmol), ácido 5-formil-4-metil-1 *H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida (125 mg, 0.5 mmol), 0.1 mL de piperidina y 10 mL de etanol se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El precipitado amarillo se filtró luego se enfrió con un baño de hielo, se lavó con etanol frío y se secó para proporcionar 185 mg (92%) de 5-(4-cloro-2-oxo-1,2-

dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-3-ilidenemetil)-4-metil-1*H*-pirrol-2-ácido carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida.

Una mezcla de ácido 5-(4-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-3-ilidenemetil)-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida (10 mg, 0.024 mmol), 3-cloro-4-fluoro-fenilamina (50 mg, 0.34 mmol), monohidrato de ácido *p*-toluensulfónico de (5 mg, 0.026 mmol) y 1 mL de éter de 2-metoxietilo se calentó a 180-190°C en un tubo sellado durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El residuo se purificó a continuación usando placas de TLC preparativa eluyendo con 10% metanol en diclorometano para proporcionar ácido 5-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-2-oxo-1,2-dihidro-pirrol[2,3-*b*]piridin-3-ilidenemetil]-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida como un sólido anaranjado (el rendimiento es aproximadamente del 28%).

#### 5.4. EJEMPLO 4

**SÍNTESIS de ÁCIDO 5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHI-DRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-4-METIL-1*H*-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA, CLORHIDRATO (FORMULA 4)**

Se condensó 4-Cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (80 mg, 0.47 mmol) con ácido 5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida (124 mg, 0.47 mmol) a temperatura ambiente para proporcionar 50 mg (26%) de ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-5-ilidenemetil)-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida como un sólido amarillo.

Una mezcla de ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-5-ilidenemetil)-4-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida (44 mg, 0.11 mmol), 3-cloro-4-fluoro-fenilamina (154 mg, 1.1 mmol) y monohidrato de ácido *p*-toluenosulfónico (10.1 mg, 0.053 mmol), 1-metil-2-pirrolidinona (2.5 mL) y éter 2-metoxietílico (2.5 ml) se calentó a 190 °C durante 16 horas y se concentró. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa, luego se disolvió en HCl 2N y acetonitrilo y se secó por congelamiento para proporcionar 24 mg (39%) de clorhidrato de ácido 5-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-5-ilidenemetil]-4-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida como un sólido rojo. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.48 (s, 1H, NH), 11.79 (s, 1H, NH), 10.74 (br s, 1H, HCl), 9.33 (s, 1H), 8.83 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, H-vinil), 7.74 (dd, *J* = 2.39, 6.68 Hz, 1H), 7.38-7.47 (m, 2H), 7.35 (t, *J* = 9.03, 1H), 6.94 (s, br, 1H), 3.96 (dt, *J* = 5.74, 11.37 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.80 (t, *J* = 12.10 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.68 (dd, *J* = 5.99 & 11.61 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.52 (d, br, *J* = 12.44 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.29-3.31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.10-3.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), y 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 528 [M<sup>+</sup>].

#### 5.5. EJEMPLO 6

##### **SÍNTESIS de ÁCIDO 5-(6-OXO-4-PIPERIDIN-1-IL-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL)-1*H*-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 6)**

A una mezcla de 4-cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (85 mg, 0.5 mmol) y ácido 5-formil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida (125 mg, 0.5 mmol) en etanol (4 mL) se agregó 0.2 mL de piperidina. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. El precipitado

amarillo se filtró luego se enfrió con un baño de hielo, se lavó con etanol frío y se secó para proporcionar 114 mg (50.6%) del compuesto del título.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13.23 (br s, 1H, NH), 11.68 (br s, 1H, NH), 8.39 (m, 1H,  $\text{CONHCH}_2$ ), 8.32 (s, 1H, H-vinil), 7.11 (s, 1H), 6.91-6.98 (m, 2H), 3.56 (m, 4H,  $2\times\text{CH}_2$ ), 3.38 (m, 6H,  $3\times\text{CH}_2$ ), 2.39-2.47 (m, 6H,  $3\times\text{CH}_2$ ), 1.65 (m, 6H,  $3\times\text{CH}_2$ ). MS 452.2 [ $\text{M}^++1$ ].

#### 5.6. EJEMPLO 6

**SÍNTESIS de CLORHIDRATO DE ÁCIDO 5-[4-(1-BENCIL-1H-INDOL-5-ILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-4-METIL-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 6)**

El compuesto del título (8% de rendimiento) se preparó a partir de ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-ilidenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida y 1-bencil-1H-indol-5-ilamina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 12.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13.44 (br s, 1H, NH), 11.79 (br s, 1H, NH), 10.97 (br s, 1H, HCl), 9.28 (br s, 1H), 8.85 (br s, 1H,  $\text{CONHCH}_2$ ), 8.25 (s, 1H, H-vinil), 7.1-7.5 (m, 10H), 6.89 (br s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 3.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.84 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.52 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.29 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.12 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.53 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

#### 5.7. EJEMPLO 7

**SÍNTESIS de CLORHIDRATO de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3,5-DIMETIL-4-(3-MORFOLIN-4-IL-PROPI)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 7)**

A una mezcla de 4-cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (85 mg, 0.5 mmol) y 3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-propil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (125 mg, 0.5 mmol) en etanol (4 mL) se agregó 0.1 to 0.2 mL de piperidina. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. El precipitado amarillo se filtró luego se enfrió con un baño de hielo, se lavó con etanol frío, y se secó para proporcionar 89 mg (45%) de 4-cloro-5-[3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-propil)-1*H*-pirrol-2-ilmetileno]-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona.

El compuesto del título (10% de rendimiento) se preparó a partir de 4-cloro-5-[3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-propil)-1*H*-pirrol-2-ilmetileno]-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona y 3-cloro-4-fluoro-fenilamina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 12.

#### 6.8. EJEMPLO 8

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-(5-METIL-3*H*-IMIDAZOL-4-ILMETILEN)-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*d*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 8)**

Se condensó 4-Cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (1 eq.) con 5-metil-3*H*-imidazol-4-carbaldehído (1 eq.) a temperatura ambiente para proporcionar (76.9%) de 4-cloro-5-(5-metil-3*H*-imidazol-4-ilmetilen)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona.

El compuesto del título (23% de rendimiento) se preparó a partir de 4-cloro-5-(5-metil-3*H*-imidazol-4-ilmetilen)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona y 3-cloro-4-fluoro-fenilamina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 12 sin la conversión a la sal HCl. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.45 (br s, 1H, NH), 11.76 (br s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H), 8.31 (s, 1H, H-

vinil), 7.92 (s, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.36 (m, 1H), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

MS 371.4 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.9. EJEMPLO 9

##### **SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-(3,5-DIMETIL-1H-PIRROL-2-ILMETILEN)-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 9)**

Se condensó 4-Cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (1 eq.) con 3,5-dimetil-1H-pirrol-2-carbaldehído (1 eq.) a temperatura ambiente para proporcionar (44.5%) de 4-cloro-5-(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetilen)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona.

El compuesto del título (57% de rendimiento) se preparó a partir de 4-cloro-5-(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetilen)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona y 3-cloro-4-fluoro-fenilamina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 12 sin la conversión a la sal HCl. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.10 (br s, 1H, NH), 11.60 (br s, 1H, NH), 9.10 (s, 1H), 8.27 (s, 1H, H-vinil), 7.70 (m, 1H), 7.3-7.4 (m, 3H), 6.04 (br s, 1H), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 384.3 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.10. EJEMPLO 10

##### **SÍNTESIS de ÁCIDO 4-METIL-5-[4-(4-METIL-PIPERAZIN-1-IL)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 10)**

El compuesto del título (47% de rendimiento) se preparó a partir ácido de 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-ilidenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida y 1-metilpiperazina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 14. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz,

DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.37 (br s, 1H, NH), 11.83 (br s, 1H, NH), 10.56 (v br s, 1H), 8.45 (v br s, 1H), 8.38 (s, 1H, H-vinil), 7.09 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 3.4-3.6 (m, 10H, 5xCH<sub>2</sub>), 2.85 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.4-2.6 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 2.49 (under DMSO, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 481.3 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.11. EJEMPLO 11

**SÍNTESIS de 5-(5-METIL-3H-IMIDAZOL-4-ILMETILEN)-4-(4-METIL-PIPERAZIN-1-IL)-5,7-DIHIDRO-PIRROLO [2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 11)**

El compuesto del título (49% de rendimiento) se preparó a partir de 4-cloro-5-(5-metil-3H-imidazol-4-ilmetilen)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona y 1-metilpiperazina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 14. MS-EI 325 [M<sup>+</sup>].

#### 5.12. EJEMPLO 12

**SÍNTESIS de CLORHIDRATO DE ÁCIDO 5-[4-(1-BENCIL-1H-INDOL-5-ILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 12)**

Una mezcla de ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida, ácido 1-bencil-1H-indol-5-ilamina y ácido *p*-toluenosulfónico (5 mg) en 2 mL de 1-metil-2-pirrodinona y éter 2-metoxietílico (1:3) se calentó a 170-185°C durante 7 a 15 horas. La mezcla de la reacción se evaporó hasta la sequedad y se purificó por HPLC de fase inversa, luego se disolvió en HCl 2N y acetonitrilo y se secó por congelamiento para proporcionar 13.5 mg (42%) del compuesto del título. MS 589.3 [M<sup>+</sup>+1].

**5.13. EJEMPLO 13****SÍNTESIS de ÁCIDO 5-(4-MORFOLIN-4-IL-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL)-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 13)**

El compuesto del título (35% de rendimiento) se preparó a partir de ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida y morfolina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 14. MS-EI 453 [M<sup>+</sup>].

**5.14. EJEMPLO 14****SÍNTESIS de 5-(5-METIL-3H-IMIDAZOL-4-ILMETILEN)-4-MORFOLIN-4-IL-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 14)**

Una mezcla de 4-cloro-5-(5-metil-3H-imidazol-4-ilmetilen)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (26 mg, 0.1 mmol) y morfolina (100 mg, 1.15 mmol) en etanol (1.5 mL) se calentó en un tubo sellado a 110°C durante 3 horas. La solución de la reacción se evaporó hasta la sequedad y se trató con etanol frío. El precipitado amarillo se filtró para proporcionar 22 mg (70.5%) del compuesto del título. MS-EI 312 [M<sup>+</sup>].

**5.15. EJEMPLO 15****SÍNTESIS de ÁCIDO 5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 15)**

Se condensó ácido 4-Cloro-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (1 eq.) con 5-formil-1H-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida (1 eq.) y trietilamina en etanol a temperatura ambiente para proporcionar (92.5%) de

ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-5-ilidenemetil)-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida.

El compuesto del título (16% de rendimiento) se preparó a partir de ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-5-ilidenemetil)-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida y 3-cloro-4-fluoro-fenilamina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 12 sin la conversión a Sal de HCl. MS 512.3 [ $M^+$ +1].

#### 5.16. EJEMPLO 16

**SÍNTESIS de ÁCIDO 5-[4-(3-ETINIL-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-1*H*-PIRROL-2- CARBOXÍLIC (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA, CLORHIDRATO (FORMULA 16)**

El compuesto del título (20% de rendimiento) se preparó a partir de ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-5-ilidenemetil)-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida y 3-etinilanilina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 12. MS 484.3 [ $M^+$ +1].

#### 5.17. EJEMPLO 17

**SÍNTESIS de ÁCIDO 5-[4-(3-ETINIL-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-4-METIL-1*H*-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 17)**

El compuesto del título (15% de rendimiento) se preparó a partir de ácido 5-(4-cloro-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-5-ilidenemetil)-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida y 3-etinilanilina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 12 sin la conversión a sal de HCl. MS 498.2 [ $M^+$ +1].

**5.18. EJEMPLO 18****SÍNTESIS de 5-[3,5-DIMETIL-4-(3-MORFOLIN-4-IL-PROPI)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-4-(3-ETINIL-FENILAMINO)-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 18)**

El compuesto del título (7% de rendimiento) se preparó a partir de 4-cloro-5-[3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-propil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-5,7-dihidropirrolo[2,3-d]pirimidin-6-ona y 3-etinilanilina de acuerdo con el procedimiento que se describe para el Ejemplo 12 sin la conversión a sal de HCl. MS 483.3  $[M^{+}+1]$ .

**5.19. EJEMPLO 19****SÍNTESIS de ÁCIDO 3-[5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-2,4-DIMETIL-1H-PIRROL-3-IL]-PROPIÓNICO (FORMULA 19)**

A una solución de 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (767.9 mg, 5 mmol) y 3-cloro-4-fluoro-fenilamina (873.4 mg, 6 mmol) en 25 mL de DMF seco bajo nitrógeno se agregó trifluorometansulfonato de plata (1.54 g, 6 mmol). La mezcla se agitó a 95°C durante 15 horas. Se enfrió la reacción, se diluyó con acetato de etilo (70 mL) y se filtró a través de celite, se lavó enérgicamente con acetato de etilo. El filtrado se lavó con salmuera (5x). La salmuera se extrajo con acetato de etilo el que a continuación se lavó con salmuera. El acetato de etilo combinado se secó (sulfato de magnesio), se concentró y purificó para proporcionar 1.22 g (93%) de (3-cloro-4-fluoro-fenil)-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-amina como un sólido blancuzco. m.p. 274-275 °C.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.78 (br s, 1H, NH), 9.41 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.28 (m, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.37 (t, 1H), 7.25 (m, 1H), 6.76 (m, 1H). MS 263.4  $[M^{+}+1]$ .

A una solución agitada de (3-cloro-4-fluoro-fenil)-(7H-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-amina (26.3 mg, 0.1 mmol) en un mL de t-butanol se agregó por porciones 64 mg (0.2 mmol) de perbromuro de bromuro de piridinio (PBPB). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua, sulfato de sodio acuoso, salmuera, se secó y se concentró para proporcionar 5,5-dibromo-4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (usando en el paso siguiente sin ninguna purificación).

Se agitó una mezcla de 5,5-dibromo-4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (del párrafo anterior), polvo de zinc en 2 mL de ácido acético a temperatura ambiente durante una hora. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se filtró. El filtrado se lavó con agua, bicarbonato de sodio y salmuera, se secó, se concentró y se purificó para proporcionar 11.2 mg (rendimiento combinado de 40% para los dos pasos) de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona como un sólido blancuzco.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.08 (br s, 1H, NH), 9.02 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.02 (m, 1H), 7.58 (m, 1H), 7.35 (t, 1H), 3.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). MS 279.3 [ $\text{M}^++1$ ].

Una mezcla de ácido 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (6.3 mg, 0.0226 mmol), 3-(5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-il)- propiónico (4.9 mg, 0.0249 mmol) y piperidina (4 gotas) en etanol (1 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción se concentró y se purificó (HPLC de fase inversa) para proporcionar 5.2 mg (51%) del compuesto del título. MS 456.4 [ $\text{M}^++1$ ].

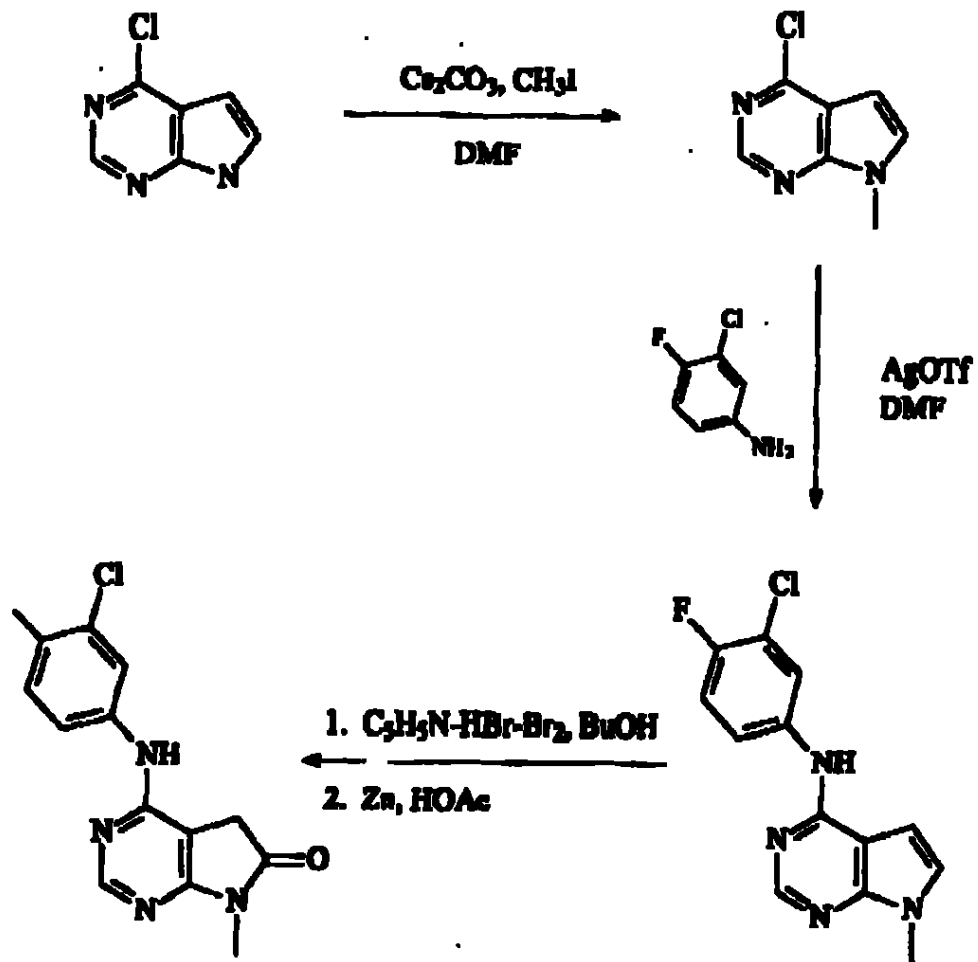
#### 5.20. EJEMPLO 20

## SÍNTESIS

de

**4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-7-METIL-6,7-DIHI-DRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA**

En este método específico de la invención, el compuesto del título se prepara de acuerdo con el Esquema 5:



ESQUEMA 5

De acuerdo con el Esquema 5, carbonato de cesio (968 mg, 3 mmol) seguido por yoduro de metilo (1 g, 7.1 mmol) se agregó a una solución de 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (121 mg, 0.79 mmol) en DMF (5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La reacción se vertió en agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó, se concentró y se sometió a cromatografía de columna para proporcionar 116 mg (88%) de 4-cloro-7-metil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina como un sólido blanco.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ ) 8.62 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

Una mezcla de 4-cloro-7-metil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (398.8 mg, 2.4 mmol) y 3-cloro-4-fluoro-fenilamina (378 mg, 2.6 mmol) en DMF (6 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se agregó triflato de plata (672 mg, 2.6 mmol), la mezcla se agitó a continuación a 90°C durante 2 horas. A continuación, se diluyó la reacción con acetato de etilo y se filtró el precipitado, lavándolo con solución al 10% de amoníaco. El filtrado se extrajo con acetato de etilo, se secó y se concentró. El residuo se trituró con acetato de etilo y se filtró para proporcionar 549.1 mg (83%) de (3-cloro-4-fluoro-fenil)-(7-metil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-amina como un sólido blancuzco.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) 9.48 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H), 8.29 (dd,  $J = 2.7$  & 6.8 Hz, 1H), 7.75-7.80 (m, 1H), 7.37 (t,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 6.77 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 3.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 277 [M<sup>+</sup>+1].

Se agregó PBPB (2.8 g, 7.8 mmol) por porciones a la (3-cloro-4-fluoro-fenil)-(7-metil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-amina (1.08 g, 3.9 mmol) suspendida en *tert*-butanol (20 mL) y ácido acético (10 mL). Luego de

agitar a temperatura ambiente durante 18 horas, se agregó polvo por porciones a la mezcla de zinc (760 mg, 11.7 mmol) y se continuó agitando durante toda la noche. El precipitado se filtró y el filtrado se concentró. El residuo se trituró con un poco de agua y el precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con un poco de acetato de etilo y se secó para proporcionar 1.12 g (98%) de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-metil-5,7-dihidro-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona como un sólido coloreado tostado.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) 9.07 (s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H), 8.01 (d,  $J = 2.6$  & 7.2 Hz, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.34 (t,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 3.46 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### 5.21. EJEMPLO 21

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3,5-DIMETIL-4-(3-OXO-3-PIRROLIDIN-1-IL-PROPI)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]IRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 24)**

Se agitó una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 3,5-dimetil-4-(3-oxo-3-pirrolidin-1-il-propil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (64.6 mg, 0.26 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 2 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 65 mg (51%) del compuesto del título.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.18 (br s, 1H, NH), 11.61 (br s, 1H, NH), 9.13 (br s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.70 (dd,  $J = 2.4$  & 6.9 Hz, 1H), 7.31-7.42 (m, 3H), 3.25 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.63 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.76 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>). MS 509 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.22. EJEMPLO 22

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-(3-METIL-5-[3-(4-METIL-PIPERAZIN-1-IL)-3-OXO-PROPI]-1H-PIRROL-2-ILMETILENO)-5,7-DIHIDRO-PIRROLO [2,3-D] PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 26)**

A una solución de ácido 3-(5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-il)- propiónico (271.8 mg, 1.5 mmol) en DMF (4mL) se agregó HOBt (243.2 mg, 1.8 mmol), EDC (345.1 mg, 1.8 mmol) y a continuación 1-metilpiperazina (0.2 mL, 1.8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante toda la noche. La reacción se virió en bicarbonato de sodio saturado (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se secó, se concentró y se sometió a cromatografía de columna (MeOH/DCM) para proporcionar 325.2 mg (82%) de 3-metil-5-[3-(4-metil-piperazin-1-il)-3-oxo-propil]-1H-pirrol-2-carbaldehído como un sólido blanco.

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 3-metil-5-[3-(4-metil-piperazin-1-il)-3-oxo-propil]-1H-pirrol-2-carbaldehído (79 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó en un baño de aceite a 65°C durante 2 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente durante toda la noche. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol (5x) y se secó para proporcionar 88.9 mg (66%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.15 (s, 1H, NH), 11.55 (br s, 1H, NH), 9.08 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.69 (dd, J = 2.5 & 6.9 Hz, 1H), 7.30-7.40 (m, 3H), 6.08 (d, J = 2.23 Hz, 1H), 3.43 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.89 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.68 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.24 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.16 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>). MS 524 [M<sup>+</sup>+1].

**5.23 EJEMPLO 23**

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3-METIL-5-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILEN]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 28)**

A una suspensión de ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2- carboxílico (4 g, 26 mmol) en DMF (80 mL) se agregó morfolina (1.9 mL, 31 mmol), seguido por EDAC (5.9 g, 31 mmol), HOBt (4.2 g, 31 mmol) y trietilamina (8 mL, 62 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El precipitado se filtró, lavando con hexano y el filtrado a continuación se concentró, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (2x100 mL). La capa acuosa se ajustó a pH = 9 usando carbonato de sodio y se extrajo nuevamente. La capa orgánica combinada se concentró y re-suspendió en acetato de etilo. El precipitado resultante se recolectó por filtración al vacío para proporcionar 3 g de sólido. El filtrado se purificó sometiéndolo a cromatografía de columna para proporcionar 1.2 g del sólido. El rendimiento total recolectado fue de 4.2 g (73%) de 3-metil-5-(morfolina-4-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído como un sólido amarillo claro. <sup>1</sup>H NMR (30 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.24 (br s, 1H, NH), 9.71 (s, 1H, CHO), 6.39 (s, 1H), 3.59 (br s, 8H, 4xCH<sub>2</sub>), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

Una mezcla de 4-(3-cloro- 4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (93 mg, 0.33 mmol), 3-metil-5-(morfolina-4-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (73 mg, 0.33 mmol), y piperidina (1 gota) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 110.3 mg (69%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.43 (br s, 1H, NH), 11.74 (br s, 1H, NH), 9.23 (br s,

1H), 8.33 (s, 1H), 7.73 (dd,  $J = 2.5$  &  $6.7$  Hz, 1H), 7.44 (m, 1H), 7.32-7.37 (m, 2H), 6.61 (d,  $J = 2.28$  Hz, 1H), 3.69 (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.65 (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). MS 483 [ $\text{M}^+$ ].

#### 5.24. EJEMPLO 24

##### **SÍNTESIS de ÁCIDO 3-{2-[4-(3-CLORO-4-FLUORO -FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*d*]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-5-ISOPROPIL-1*H*-PIRROL-3-IL}-PROPIÓNICO (FORMULA 27)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), ácido 3-(2-formil-5-isopropil-1*H*-pirrol-3-il)-propiónico (54.4 mg, 0.26 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con agua, HCl 1N, agua y finalmente etanol, se secó en horno de vacío para proporcionar 83 mg (71%) del compuesto del título.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  13.44 (br s, 1H, NH), 12.15 (br s, 1H, COOH), 11.69 (br s, 1H, NH), 9.02 (br s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.77 (dd,  $J = 2.5$  &  $6.4$  Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.33 (t,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 6.14 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 3.01 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.83 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.21.27 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ). MS 489 [ $\text{M}^+ + 1$ ].

#### 5.25 EJEMPLO 25

##### **SÍNTESIS de ÁCIDO 5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*d*]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-2,4-DIMETIL-1*H*-PIRROL-3-CARBOXÍLICO (2-DIETILAMINO-ETIL)-AMIDA (FORMULA 28)**

Una mezcla de ácido 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (66 mg, 0.24 mmol), 5-formil-2,4-dimetil

*N*-1*H*-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)-amida (63.7 mg, 0.24 mmol) y piperidina (1 gota) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 78.5 mg (62%) del compuesto del título.

<sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.33 (br s, 1H, NH), 11.61 (br s, 1H, NH), 9.17 (br s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.69 (dd, *J* = 2.5 & 6.5 Hz, 1H), 7.35 (m, 4H), 3.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.5 (m, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> & CH<sub>2</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.96 (t, *J* = 7 Hz, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). MS 526 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.26. EJEMPLO 26

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3-METIL-4-(4-METIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)-1*H*-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 29)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 3-metil-4-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (70.7 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol para proporcionar 63 mg (51%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

<sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.29 (br s, 1H, NH), 11.73 (br s, 1H, NH), 9.16 (br s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.72 (dd, *J* = 2.7 & 6.5 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.34 (t, *J* = 9.05 Hz, 1H), 3.49 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.29 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 496 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.27. EJEMPLO 27

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3,5-DIMETIL-4-(3-MORFOLIN-4-IL-3-OXO-PROPI)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 30)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol-2-ilmetileno[2,3-d]pirimidin-6-ona (86 mg, 0.31 mmol), 3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-3-oxo-propil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (83 mg, 0.31 mmol) y piperidina (1 gota) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar el compuesto del título. MS 525 [M<sup>+</sup>+1].

**5.28. EJEMPLO 28**

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3-METIL-4-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 31)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol-2-ilmetileno[2,3-d]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 3-metil-4-(morfolina-4-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (66.7 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 39 mg (32%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.30 (br s, 1H, NH), 11.69 (br s, 1H, NH), 9.16 (br s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.72 (dd, J = 2.8 & 6.7 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.35 (t, J = 9 Hz, 1H), 3.59 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.51 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 483 [M<sup>+</sup>+1].

**5.29. EJEMPLO 29**

**SÍNTESIS de ÁCIDO 5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-7-METIL-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-4-METIL-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 32)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-metil-5,7-dihidro-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-ona (244 mg, 0.83 mmol), ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida (1.2 equiv.) y piperidina (1 gota) en etanol y DMF (2 mL) se agitó a 90°C durante 2 horas. La reacción se diluyó con agua y el precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con agua, acetato de etilo y hexano y se secó para proporcionar 138.5 mg (31%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.39 (br s, 1H, NH), 9.29 (br s, 1H), 8.38 (m, 2H), 7.72 (m 1H), 7.39 (s, 1H, H-vinil), 7.34 (m, 2H), 6.81 (s, 1H), 3.56 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.41 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 540 [M<sup>+</sup>+1].

**5.30. EJEMPLO 30**

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[5-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 33)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 5-(morfolina-4-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (62.5 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 69 mg (59%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.41 (br s,

1H, NH), 11.65 (br s, 1H, NH), 8.81 (br s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.75 (m, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.38 (t,  $J = 9.05$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 6.76 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 3.71 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.65 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>). MS 489 [M<sup>+</sup>+1].

### 5.31. EJEMPLO 31

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-7-METIL-5-[3-METIL-5-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 34)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-metil-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidín-6-ona (116 mg, 0.4 mmol), 3-metil-5-(morfolina-4-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (130 mg) y piperidina (1 gota) en etanol (2 mL) se agitó a 90°C durante 2 horas. La reacción se diluyó con agua y el precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con agua, acetato de etilo y hexano y se secó para proporcionar 141 mg (74%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.42 (br s, 1H, NH), 9.29 (br s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.34-7.41 (m, 3H), 6.6 (s, 1H), 3.67 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.65 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 497 [M<sup>+</sup>+1].

### 5.32. EJEMPLO 32

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[4-METIL-5-(4-METIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 35)**

Se agregó ácido acético (360 mL) y agua (300 mL) a una solución de 3,5-dimetil-2-pirrolcarboxilato de etilo (5 g, 29.9 mmol) en THF (300 mL). La

mezcla se enfrió to  $-10$  to  $-5$  °C durante 30 minutos. A continuación, se agregó a la mezcla nitrato de amonio cárico (CAN, 67.21 g, 122.6 mmol) durante un período de 30 minutos. La mezcla se agitó de  $-10$  a  $-5$ °C durante 1.5 horas. La reacción se diluyó con agua (800 mL) y se extrajo con diclorometano (3x). Los extractos combinados se lavaron con solución de bicarbonato de sodio hasta que la capa acuosa se hizo básica, se secó y se concentró. El residuo se purificó en una columna de gel de sílice (10% EtOAc en hexane) para proporcionar 2.4 g (44%) de etiléster de ácido 5-formil-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico como un sólido blanco.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.61 (br s, 1H, NH), 9.64 (s, 1H, CHO), 6.78 (s, 1H), 4.27 (q,  $J = 7.17$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.30 (t,  $J = 7.17$  Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). MS 182 [ $\text{M}^+ + 1$ ].

Se agregó hidróxido de litio (8.73 g, 36.44 mmol) al etiléster de ácido 5-formil-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (1.32 g, 7.27 mmol) en metanol (27 mL) y agua (9 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. La reacción se diluyó con agua (10 mL), se evaporó la mayor parte del metanol y se lavó con éter. La capa acuosa se acidificó con HCl 1N (37 mL) a pH = 2, se extrajo con acetato de etilo. Se lavó con salmuera, se secó y se concentró. El residuo se lavó con diclorometano y se filtró para proporcionar 0.98 g (88%) de ácido 5-formil-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico como un sólido tostado.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.87 (br s, 1H, COOH), 12.41 (br s, 1H, NH), 9.63 (s, 1H, CHO), 6.74 (s, 1H), 2.26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

A una solución de ácido 5-formil-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (306.3 mg, 2 mmol) en DMF 5 mL se agregó HOBt (324.3 mg, 2.4 mmol), EDC (460.1 mg, 2.4 mmol) y a continuación 1-metilpiperazina (0.27 mL, 2.4 mmol). La

mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante toda la noche. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo varias veces con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó, se concentró y se sometió a cromatografía de columna (MeOH/DCM) para proporcionar 310 mg (66%) de 4-metil-5-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído como un amarillo claro espuma sólida.

<sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.20 (br s, 1H, NH), 9.47 (s, 1H, CHO), 6.80 (s, 1H), 3.58 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.44 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 4-metil-5-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (70.6 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 89.1 mg (72%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.13 (br s, 1H, NH), 11.74 (br s, 1H, NH), 8.77 (br s, 1H, NH), 8.27 (s, 1H), 7.75 (dd, *J* = 2.7 & 6.5 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.38 (t, *J* = 8.85 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 3.52 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.37 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 496 [M<sup>+</sup>+1].

### 5.33. EJEMPLO 33

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-7-METIL-5-[3-METIL-5-(4-METIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)-1*H*-PIRROL-2-ILMETILE N]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO [2,3-*D*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 36)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-metil-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (80 mg, 0.27 mmol), 3-metil-5-

(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (1.2 equiv.) y piperidina (1 gota) en etanol (2 mL) se agitó a 90°C durante 2 horas. La reacción se diluyó con agua y el precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con agua, acetato de etilo y hexano y se secó para proporcionar 120.5 mg (72%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.42 (br s, 1H, NH), 9.32 (br s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.35-7.41 (m, 3H), 6.60 (s, 1H), 3.69 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.35 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 510 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.34. EJEMPLO 34

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[4-METIL-5-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1*H*-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DI HIDRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 37)**

A una solución de ácido 5-formil-3-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (306.3 mg, 2 mmol) en DMF (5 mL) se agregó HOBt (324.3 mg, 2.4 mmol), EDC (460.1 mg, 2.4 mmol) y a continuación morfolina (0.21 mL, 2.4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante toda la noche. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo varias veces con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó, se concentró y se sometió a cromatografía de columna (MeOH/DCM) para proporcionar 395 mg (89%) de 4-metil-5-(morfolina-4-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído como una espuma sólida de color amarillo claro. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.18 (br s, 1H, NH), 9.46 (s, 1H, CHO), 6.79 (s, 1H), 3.43 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.29 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7- dihidro-pirrol [2,3-*d*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 4-metil-5-(morfolina-4-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (66.7 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 105 mg (87%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.16 (br s, 1H, NH), 11.74 (br s, 1H, NH), 8.78 (br s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.74 (dd, *J* = 2.2 & 6.5 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.38 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 3.65 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.54 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 483 [M<sup>+</sup>+1].

### 5.35. EJEMPLO 35

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-(3,5-DIMETIL-1*H*-PIRROL-2-ILMETILEN)-7-METIL-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 38)**

Se condensó 4-(3-Cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-metil-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (100 mg, 0.34 mmol) con 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (50 mg, 0.41 mmol) y piperidina (2 gotas) en etanol (3 mL) a 80°C durante 2 horas para proporcionar 50 mg (37%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.07 (br s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.30-7.40 (m, 2H), 6.05 (s, 1H), 3.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 398 [M<sup>+</sup> +1].

### 5.36 EJEMPLO 36

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3-METIL-5-(4-METIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)-1*H*-PIRROL-2-ILMETILEN]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 39)**

A una suspensión de ácido 5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (1.53 g, 10 mmol) en DMF (20 mL) se agregó 1-metilpiperazina (1.2 g, 12 mmol), seguido por clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 2.3 g, 12 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, 1.6g, 12 mmol) y trietilamina (3.2 mL, 24 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La reacción se concentró, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (5x). El acetato de etilo combinado se concentró a un volumen de 20 mL y se trituró con hexano (10 mL). El sólido resultante se recolectó por filtración al vacío para proporcionar 1.6 g (68%) de 3-metil-5-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído como un sólido amarillo. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.21 (s, 1H, NH), 9.7 (s, 1H, CHO), 6.35 (s, 1H), 3.58 (m, 4H 2xCH<sub>2</sub>), 2.30 (m, 7H, 2xCH<sub>2</sub> & CH<sub>3</sub>), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 236 [M<sup>+</sup>+1].

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidropirolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol) y 3-metil-5-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (70.6 mg, 0.30 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 124 mg (100%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.41 (s, 1H, NH), 11.77 (br s, 1H, NH), 9.22 (br s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.72 (dd, *J* = 2.7 & 6.6 Hz, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.32-7.37 (m, 2H), 6.58 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.68 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.36 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 496 [M<sup>+</sup>+1].

### 5.37. EJEMPLO 37

**SÍNTESIS de ÁCIDO 3-(5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-7-METIL-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-2,4-DIMETIL-1H-PIRROL-3-IL)-PROPIÓNICO (FORMULA 40)**

Se condensó 4-(3-Cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-metil-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (100 mg, 0.34 mmol) con ácido 3-(5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-il)-propiónico (80 mg, 0.41 mmol) y piperidina (2 gotas) en etanol (3 mL) a 80°C durante 2 horas para proporcionar 38 mg (23%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.15 (br s, 1H, NH), 12.07 (br s, 1H, COOH), 9.18 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.30-7.39 (m, 2H), 3.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**5.38. EJEMPLO 38**

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3,5-DIMETIL-4-(4-METIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 41)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 3,5-dimetil-4-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (74.8 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 102 mg (60%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.27 (br s, 1H, NH), 11.66 (br s, 1H, NH), 9.12 (br s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.40 (m, 1H), 7.31-7.36 (m, 2H), 3.43 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.27 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 510 [M<sup>+</sup>+1].

**5.39. EJEMPLO 39**

**SÍNTESIS de ÁCIDO 3-(5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-7-METIL-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO [2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-4-METIL-1H-PIRROL-2-IL)-PROPIÓNICO (FORMULA 42)**

Se condensó 4-(3-Cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-metil-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (100 mg, 0.34 mmol) con ácido 3-(5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-il)-propiónico (62 mg, 0.41 mmol) y piperidina (2 gotas) en etanol (3 mL) se agitó 80°C durante 2 horas para proporcionar 31 mg (20%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.14 (br s, 1H, NH), 9.14 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.30-7.40 (m, 3H), 6.08 (s, 1H), 3.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**5.40. EJEMPLO 40**

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3,5-DIMETIL-4-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 43)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 3,5-dimetil-4-(morfolina-4-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (70.9 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 98.5 mg (79%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.28 (br s, 1H, NH), 11.68 (br s, 1H, NH), 9.12 (br s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.40 (m, 1H), 7.31-7.36 (m, 2H), 3.56 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.45 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 497 [M<sup>+</sup>+1].

**5.41. EJEMPLO 41****SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[3,5-DIMETIL-4-(3-MORFOLIN-4-IL-PROPI)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-7-METIL-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 44)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-metil-5,7-dihidropirrolo[2,3-d]pirimidin-6-ona (100 mg, 0.34 mmol), 3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-propil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (85 mg, 0.34 mmol) y piperidina (2 gotas) en etanol (3 mL) se agitó a 80°C durante 1 hora. La reacción se concentró y se sometió a cromatografía de columna para proporcionar 46 mg (26%) del compuesto del título como un sólido amarillo claro. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.14 (br s, 1H, NH), 9.17 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.35 (s, 1H, H-vinil), 7.32 (m, 2H), 3.55 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.30 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

**5.42. EJEMPLO 42****SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[5-(4-METIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 45)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidropirrolo[2,3-d]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 5-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (66.4 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 101.5 mg (84%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.39 (br s, 1H, NH), 11.74 (br s, 1H, NH), 8.81 (br s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.76 (s,

1H), 7.75 (m, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.39 (t,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 6.91 (m, 1H), 6.74 (m, 1H), 3.70 (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.37 (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.21 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). MS 482  $[\text{M}^++1]$ .

#### 5.43. EJEMPLO 43

##### **SÍNTESIS de 5-[3-METIL-5-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 46)**

Una mezcla de 4-cloro-5-[3-metil-5-(morfolina-4-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (37 mg, 0.1 mmol) y (R)-(+)-1-feniletilamina (121 mg, 1 mmol) en 2-metoxietanol (0.5 mL) se calentó a 110-120°C durante 1.5 horas. La reacción se diluyó con agua y se filtró. El precipitado se lavó con agua, algo de etanol, acetato de etilo, hexano y se secó para proporcionar 38.1 mg (81%) del compuesto del título como un sólido amarillo. MS 459  $[\text{M}^++1]$ .

#### 5.44. EJEMPLO 44

##### **SÍNTESIS de ÁCIDO 5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-4-METIL-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (FORMULA 47)**

Se agitó una mezcla de ácido 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (45.9 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) a temperatura ambiente durante 4 días. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó, luego se lavó con HCl 1N (3x), agua (5x) y se secó para proporcionar 88.8 mg (86%) del compuesto del título.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.55 (br s, 1H, NH), 11.84 (br s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H),

8.34 (s, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.38 (t,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 6.74 (d,  $J = 2.15$  Hz, 1H), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 414 [ $M^+ + 1$ ].

#### 5.45. EJEMPLO 45

**SÍNTESIS de 5-[3-METIL-5-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-4-PIPERIDIN-1-IL-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 48)**

Una mezcla de 4-cloro-5,7-dihidro-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (169 mg, 1 mmol), 3-metil-5-(morfolina-4-carbonil)-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (222 mg, 1 mmol) y piperidina (2 gotas) en etanol (3 mL) se calentó a reflujo durante toda la noche. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con acetato de etilo/ hexano y se secó para proporcionar 332.2 mg (79%) del compuesto del título como un sólido amarillo. MS 423 [ $M^+ + 1$ ].

#### 5.46. EJEMPLO 46

**SÍNTESIS de ÁCIDO 3-{5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D] PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-4-METIL-1H-PIRROL-2-IL}-PROPIÓNICO (FORMULA 49)**

Se agregó *tert*-butoxido de sodio (1.37 g, 14.3 mmol) se agregó al bromuro de *tert*-butoxicarbonilmetil)trifenilfosfona seco (6.56 g, 14.3 mmol) en THF (anhidro, 30 mL) bajo nitrógeno. Se agregó a la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A la mezcla se agregó etiléster de ácido 5-formil-3-metil-1*H*-pirrol-2- carboxílico (2.36 g, 13 mmol) en THF (35 mL). La mezcla se agitó a continuación a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante toda la noche. El sólido se filtró y el filtrado se concentró seguido por cromatografía de columna (10% EtOAc en hexano) para proporcionar 2.95 g (81 %) de 5-(2-*tert*-butoxicarbonil-vinil)-3-metil-1*H*- pirrol-2-ácido carboxílico

etiléster.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.85 (br s, 1H, NH), 7.35 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.41 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H), 4.23 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 2.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.44 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 1.28 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). MS 279 [ $\text{M}^+$ ].

Una solución de etiléster de ácido 5-(2-*tert*-butoxicarbonil-vinil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (2.48 g) en acetato de etilo (60 mL) y etanol (30 mL) se hidrogenó usando paladio sobre carbón 1% a temperatura ambiente durante toda la noche para proporcionar 2.49 g (100%) etiléster de ácido 5-(2-*tert*-butoxicarbonil-etil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico como un sólido blanco.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.12 (br s, 1H, NH), 5.74 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 4.17 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 2.71 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.47 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.18 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.36 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ), 1.28 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). MS 282 [ $\text{M}^++1$ ].

Se agregó hidróxido de litio (1.02 g, 42.65 mmol) a una suspensión de etiléster de ácido 5-(2-*tert*-butoxicarbonil-etil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (2.4 g, 8.53 mmol) en metanol (50 mL) y agua (12 mL). Se agregó etanol (4 mL) a la mezcla (para la solvatación del material inicial) y se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se diluyó con agua (20 mL), se concentró (para separar la mayor parte del alcohol) y se extrajo con éter. A continuación, la capa acuosa se acidificó a pH = 2 usando HCl 1N (43 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2x). A continuación se lavó el extracto combinado con salmuera, se secó y se concentró para proporcionar 1.89 g de etiléster de ácido 5-(2-carboxi-etil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico como un sólido blanco.

Una mezcla de etiléster de ácido 5-(2-carboxi-etil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (1.8 g, 8 mmol) e hidróxido de litio (1.94 g, 8 mmol) en THF (40 mL) y agua (48 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 días, luego en un baño de aceite de 80°C durante 4 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se acidificó a pH = 2 usando HCl concentrado, se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica a continuación se secó y se concentró para proporcionar 1.32 g de ácido 5-(2-carboxi-etil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico.

Una solución de ácido 5-(2-carboxi-etil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (1.3 g, 6.59 mmol) en trifluoroácido acético (6 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se enfrió a 0°C y se agregó ortoformato de trietilo (6 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 10 minutos y a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se vertió en agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se secó y se concentró para proporcionar 1.2 g de 3-(5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2-il)-ácido propiónico como un sólido marrón. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.17 (br s, 1H), 11.50 (br s, 1H), 9.44 (s, 1H, CHO), 5.85 (s, 1H), 2.74 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 182 [M<sup>+</sup>+1].

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidropirrolo[2,3-*c*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 3-(5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-2-il)-ácido propiónico (54.4 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. La reacción se concentró, el residuo se disolvió en agua y se acidificó con HCl 1N a pH=2. El sólido resultante, a continuación, se lavó con agua, etanol y se secó para proporcionar 93.9 mg (85%) del compuesto del título. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.18 (br s, 1H, NH), 12.19 (br s, 1H, COOH), 11.61 (br s, 1H,

NH), 9.09 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.30-7.35 (m, 2H), 6.07 (s, 1H), 2.90 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.60 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 442 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.47. EJEMPLO 47

**SÍNTESIS de 4-(INDAN-4-ILAMINO)-5-[3-METIL-5-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 50)**

Una mezcla de 4-cloro-5-[3-metil-5-(morfolina-4-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-5,7-dihidro-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-ona (50 mg, 0.13 mmol), 5-aminoindan (178.12 mg, 1.3 mmol) en 2-metoxietanol (0.6 mL) se calentó a 110-120°C durante 8 horas y se extrajo con acetato de etilo/ agua. La capa orgánica se concentró, el residuo se trituró con acetona y se filtró para proporcionar 29 mg de a sólido amarillo. El licor madre se concentró y se sometió a cromatografía de columna para proporcionar 10.1 mg del producto. El rendimiento total fue de 39.1 mg (64%) del compuesto del título como un sólido amarillo. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.42 (br s, 1H, NH), 11.74 (br s, 1H, NH), 9.11 (br s, 1H), 8.27 (s, 1H, H-vinil), 7.25 (br s, 1H, NH), 7.04-7.15 (m, 3H), 6.57 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 3.63 (m, 8H, 4xCH<sub>2</sub>), 2.79 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). MS 471 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.48. EJEMPLO 48

**SÍNTESIS de ÁCIDO {5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-2,4-DIMETIL-1H-PIRROL-3-IL}- ACÉTICO (FORMULA 51)**

Se agitó una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrolo [2,3-d]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), ácido (5-formil-2,4-dimetil-1H-

pirrol-3-il)- acético (54.3 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) a temperatura ambiente durante 1 día. La reacción se concentró, el residuo se suspendió en HCl 1N. El precipitado se filtró, se lavó con agua, suspendió en acetato de etilo caliente, se filtró y se secó para proporcionar 42 mg (38%) del compuesto del título.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.21 (br s, 1H, NH), 12.17 (br s, 1H, COOH), 11.65 (s, 1H, NH), 9.13 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.3-7.4 (m, 3H), 3.37 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.3 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 442 [ $\text{M}^+ + 1$ ].

#### 5.49 EJEMPLO 49

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-5-[5-(3,5-DIMETIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)-3-METIL-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 52)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol [2,3-*d*]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 5-(3,5-dimetil-piperazina-1-carbonil)-3-metil-1H-pirrol-2-carbaldehído (74.8 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante durante toda la noche. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 93.1 mg (73%) del compuesto del título como un sólido amarillo.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.39 (br s, 1H, NH), 11.75 (br s, 1H, NH), 9.23 (br s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.73 (dd,  $J = 2.6$  & 6.7 Hz, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.33-7.38 (m, 2H), 6.57 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 4.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.52 (m, 2H, 2xCH), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.99 (d,  $J = 6$  Hz, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 0.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS 510 [ $\text{M}^+ + 1$ ].

#### 5.50. EJEMPLO 50

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)- 5-[3-METIL-5-(3,4,5-TRIMETIL-PIPERAZINA -1-CARBONIL)-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 53)**

Se condensó 4-(3-Cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona con 3-metil- 5-(3,4,5-trimetil-piperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2- carbaldehído para proporcionar el compuesto del título.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.41 (br s, 1H, NH), 11.78 (br s, 1H, NH), 9.23 (br s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.72 (dd,  $J = 2.5$  & 6.5 Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.33-7.38 (m, 2H), 6.58 (m, 1H), 4.19 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.78 (m, 2H), 2.23 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.18 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.11 (m, 2H), 1.06 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H,  $2\times\text{CH}_3$ ). MS 524 [ $\text{M}^++1$ ].

**5.51. EJEMPLO 51**

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)- 5-[5-(4-ETIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)-3-METIL-1H-PIRROL-2-ILMETILENO]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 54)**

Una mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)- 5,7-dihidro-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-ona (70 mg, 0.25 mmol), 5-(4-etil-piperazina -1-carbonil)-3-metil-1H-pirrol-2-carbaldehído (74.8 mg, 0.3 mmol) y piperidina (3 gotas) en etanol (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante durante toda la noche. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para proporcionar 93 mg (73%) del compuesto del título.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.40 (br s, 1H, NH), 11.81 (br s, 1H, NH), 9.28 (br s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.33-7.45 (m, 3H), 6.58 (m, 1H), 3.68

(m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.31-2.42 (m, 6H), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.01 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). MS 510 [M<sup>+</sup>+1].

#### 5.52. EJEMPLO 52

#### SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO) -5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 55)

A una solución de 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (767.9 mg, 5 mmol) y 3-cloro-4-fluoro-fenilamina (873.4 mg, 6 mmol) en 25 mL de DMF seco bajo nitrógeno se agregó trifluorometansulfonato de plata (1.54 g, 6 mmol). La mezcla se agitó a 95°C durante 15 horas. La reacción enfriada se diluyó con acetato de etilo (70 mL) y se filtró a través de celite, se lavó a fondo con acetato de etilo. El filtrado se lavó con salmuera (5x). La salmuera se extrajo con acetato de etilo, el cual a continuación se lavó con salmuera. El acetato de etilo combinado se secó (sulfato de magnesio), se concentró y se purificó para proporcionar 1.22 g (93%) de (3-cloro-4-fluoro-fenil)-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-amina como un sólido blancuzco. m.p. 274-275 °C. <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.78 (br s, 1H, NH), 9.41 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.28 (m, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.37 (t, 1H), 7.25 (m, 1H), 6.76 (m, 1H). MS 263.4 [M<sup>+</sup>+1].

A una solución agitada de (3-cloro-4-fluoro-fenil)-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-amina (26.3 mg, 0.1 mmol) en 1 mL de *t*-butanol se agregó por porciones 64 mg (0.2 mmol) de perbromuro de bromuro de piridinio (PBPB). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua, sulfato de sodio acuoso, salmuera, se secó y se concentró para proporcionar 5,5-dibromo-4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (usando en el paso siguiente sin ninguna purificación).

Una mezcla de 5,5-dibromo-4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (del párrafo anterior), polvo de zinc en 2 mL de ácido acético se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se filtró. El filtrado se lavó con agua, bicarbonato de sodio y salmuera, se secó, se concentró y se purificó para proporcionar 11.2 mg (rendimiento combinado de 40% para los dos pasos) de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona como un sólido blancuzco.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.08 (br s, 1H, NH), 9.02 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.02 (m, 1H), 7.58 (m, 1H), 7.35 (t, 1H), 3.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). MS 279.3 [ $\text{M}^++1$ ].

### 5.53. EJEMPLO 53

**SÍNTESIS de ÁCIDO 5-[4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMINO)-7-MORFOLIN-4-ILMETIL-6-OXO-6,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN-5-ILIDENEMETIL]-4-METIL-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (2-MORFOLIN-4-IL-ETIL)-AMIDA (FORMULA 56)**

A la suspensión de ácido 5-[4-(3-Cloro-4-fluoro-fenilamino)-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-5-ilidenmetil]-4-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida (170 mg, 0.32 mmol) en EtOH-Dioxano-DMF (2:2:1) (10 mL) se agregó *N,N'*-dimorfolinometano (0.5 mL). La mezcla se agitó a 100 °C durante 18 horas y a continuación se enfrió a temperatura ambiente. El producto se cristalizó, se filtró, se lavó con metanol, y se secó bajo alto vacío para proporcionar ácido 5-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-morfolin-4-ilmetil-6-oxo-6,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidinilidenemetil]-4-metil-1 *H*-pirrol-2-carboxílico (2-morfolin-4-il-etil)-amida en forma pura (130 mg, 65%). MS 625 [ $\text{M}^++1$ ].

**5.54. EJEMPLO 54**

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMIN )  
-5-{1-[5-(MORFOLINA-4-CARBONIL)-TIOFEN-2-IL]-METILIDEN}-5,7-DIHIDR  
O-PIRROLO[2,3-*D*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 57)**

La mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (90 mg, 0.32 mmol), 5-(morfolina-4-carbonil)-tiofen-2-carbaldehído (82 mg, 0.36 mmol), y trietilamina (2 gotas) en etanol (3 mL) se calentó a 90°C en baño de aceite durante 2 horas, y se enfrió a temperatura ambiente. El solvente se evaporó y el residuo se purificó en una columna de gel de sílice eluyendo con cloruro de metileno-metanol (98:2 y 95:5) para proporcionar 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5-{1-[5-(morfolina-4-carbonil)-tiofen-2-il]-metiliden e}-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (41 mg, 28%) pura. MS 486 [ $M^+ + 1$ ].

**5.55. EJEMPLO 55**

**SÍNTESIS de 4-(3-CLORO-4-FLUORO-FENILAMIN )  
-5-[1-(2-CLORO-4-HIDROXI-FENIL)-METILIDEN]-5,7-DIHIDRO-PIRROLO[2,3-  
-*D*]PIRIMIDIN-6-ONA (FORMULA 58)**

La mezcla de 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (100 mg, 0.36 mmol), 2-cloro-4-hidroxi-benzaldehído (84.5 mg, 0.54 mmol), y piperidina (3 gotas) en etanol (3 mL) se calentó a 80°C en baño de aceite durante 4 horas, y se enfrió a temperatura ambiente. El producto se cristalizó, se filtró, se lavó con etanol, y se secó bajo alto vacío para proporcionar 4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-5-[1-(2-cloro-4-hidroxi-fenil)-metiliden]-5,7-dihidro-pirrol[2,3-*d*]pirimidin-6-ona pura.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.52 (br s,

1H), 10.45 (br s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.35 (br s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.11 (t, 1H), 6.96 (m, 1H), 6.79 (m, 1H), 6.72 (d, 1H), 6.66 (m, 1H), 6.56 (dd, 1H). MS 418 [M<sup>+</sup>+1].

#### **5.56. EJEMPLO 56: ENSAYO PARA LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PDGFR**

Se puede determinar fácilmente la capacidad de los compuestos de la invención para modular la actividad in vitro de la PDGFR en un ensayo con inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando los siguientes reactivos, suministros, y métodos.

##### **Reactivos y Suministros**

Todas las reacciones ELISA se realizan en placas Corning 96-well ELISA (Corning, Catálogo # 25805-96). El anticuerpo monoclonal anti-PDGFR (28D4C10) se almacena a -20°C en tubos de 50 mL antes de usar. Los métodos de aislamiento de anticuerpos empleados en la presente son comúnmente conocidos en la técnica, tales como los descritos en Harlow y Lane (Harlow, E. y Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

El buffer de dilución es solución salina buffer de fosfato Dulbeccoys ((PBS); Gibco, Catálogo # 450-1300EB). Como alternativa, la PBS se puede hacer incluyendo magnesio, usando los siguientes reactivos en el siguiente protocolo. Para realizar un litro de solución madre de PBS, agregar primero aproximadamente 900 mL dH<sub>2</sub>O a un cilindro graduado de un litro al cual se agregan 2.013 gramos de KCl, 1.916 gramos de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (monobásico), 80.65 gramos de NaCl, y 11.50 gramos de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dibásico). Agitar la mezcla, y cuando esté disuelta, llevar la solución a un pH de 7.2 con HCl. Finalmente,

agregar 1.017 gramos de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (anhidro), y llevar el volumen a 1 litro de  $\text{dH}_2\text{O}$ . Nótese que la PBS puede dejarse a temperatura ambiente, pero como temperatura de almacenamiento se prefiere  $4^\circ\text{C}$ .

El buffer TBST (TBS + 0.1% Triton X-100) se usa a una concentración final de trabajo de 1x. El buffer se prepara agregando aproximadamente 900mL  $\text{dH}_2\text{O}$  a un cilindro graduado de 1 litro, y agregando 6.057 gramos de Tris y 8.766 gramos de NaCl y agitando. Cuando los reactivos están disueltos, la mezcla se lleva a un pH de 7.2 con HCl. Luego se agrega 1 mL de Triton X-100 y el volumen se lleva a 1 litro con  $\text{dH}_2\text{O}$ . Como alternativa se puede usar una solución madre de TBS que se ha preparado previamente y almacenado a  $4^\circ\text{C}$ , y a la cual se agrega Triton X-100 hasta alcanzar una concentración final de 0.1%, mediante agitación hasta que se disuelva el detergente. Nótese que el/la TBST puede dejarse a temperatura ambiente, pero como temperatura de almacenamiento se prefiere  $4^\circ\text{C}$ .

El buffer de bloqueo ELISA se prepara pesando y separando 5 gramos de leche instantánea descremada (Carnation) y volcando 100 mL de PBS (ver más arriba) en un vaso de precipitados limpio. Luego se debe agregar la leche instantánea a la PBS y agitar a temperatura ambiente hasta que la leche se haya disuelto. Cien mL de buffer de bloqueo ELISA (también denominado "buffer de bloqueo") es suficiente para aproximadamente 6 placas de ensayo. Cuando está almacenada a  $4^\circ\text{C}$ , esta solución es estable durante 1 a 2 semanas.

Se obtienen los lisados de PDGFR- $\beta$  que expresan células NIH3T3 y se almacenan a  $-80^\circ\text{C}$  en alícuotas de 1 mL. La expresión de PDGFR- $\beta$  en células eucariontes es muy conocida en la técnica. Los lisados se preparan

mediante el siguiente método. Colocar los platos de vehículos en bandejas de hielo y luego de enfriar, eliminar el medio y reemplazar con PBS enfriada con hielo. Eliminar la PBS y repetir. Aspirar la PBS restante si fuera necesario y agregar 4 mL buffer de lisis de HNTG enfriado con hielo (descrito a continuación en el Ejemplo 58) con una minipipeta para cada plato. Dejar asentar en hielo durante 5-10 minutos y luego rascar las células con un protector de goma.

Absorber el lisado con una minipipeta y agregar a un tubo centrífugo de 30 mL sobre hielo. Someter los tubos a vórtex durante 30-60 segundos y luego centrifugar durante 10 minutos a 7000 rpm en un rotor J-20 que ha sido previamente enfriado hasta por debajo de los 0 °C. Recuperar los sobrenadantes y combinarlos en un tubo de 250 mL y colocar sobre hielo. Realizar la determinación de las proteínas para medir la cantidad total de proteína por per mL de solución. Dividir el lisado en alícuotas de 1 mL y almacenar a -80°C.

Se prepara una solución de trabajo 1x de TBS buffer agregando 900 mL de dH<sub>2</sub>O a un cilindro graduado de 1 litro, y agregando 6.057 gramos de Tris y 8.766 gramos de NaCl y agitando. Cuando todos los reactivos se han disuelto, la solución se ajusta a un pH de 7.2 con HCl y el volumen se lleva a 1 litro dH<sub>2</sub>O. Se puede hacer una solución madre 10x multiplicando los montos por 10 (pero manteniendo el volumen final de 1 litro). Esta solución madre luego se diluye 10 veces con dH<sub>2</sub>O y su pH ajustado a 7.2. Nótese que la TBS puede mantenerse a temperatura ambiente, pero se almacena mejor a 4°C.

Para hacer 1 litro de una solución de trabajo 1x de TBS + 10% DMSO, agregar aproximadamente 850 mL dH<sub>2</sub>O un cilindro graduado de 1 litro y luego

agregar 6.057 gramos de Tris y 8.766 gramos de NaCl y agitar. Cuando todos los reactivos se han disuelto, pH la solución a pH 7.2 con HCl. Luego agregar 100 mL de DMSO y llevar el volumen a 1 litro con dH<sub>2</sub>O. Como alternativa agregar 25 mL DMSO a 225mL de TBS (ver más arriba). Nótese que la TBS será ahora solamente de 0.9x, pero esto no deberá afectar el ensayo.

Para hacer 1 mM de solución madre de 1 mM Adenosina-5μ-trifosfato (ATP, de músculo equino) agregar 2.75 mg ATP (Sigma, Catálogo # A-5394) a 5 mL de dH<sub>2</sub>O, y someter a vórtex. Nótese que los mayores volúmenes de solución madre pueden prepararse a condición que se use la misma relación de ATP a dH<sub>2</sub>O. Nótese también que este reactivo deberá prepararse inmediatamente antes de su uso y conservarse sobre hielo.

Se prepara una solución madre de 1 M MnCl<sub>2</sub> agregando 19.79 gramos de MnCl<sub>2</sub> a 100 ml dH<sub>2</sub>O y agitando hasta que esté disuelta. La solución luego se filtra, se esteriliza y se almacena en alícuotas de 1 ml a -80°C.

El Buffer de cinasa 10x está compuesto por las siguientes partes:

| Reactivo          | Solución madre | Cantidad por 10 mL | Concentración de trabajo |
|-------------------|----------------|--------------------|--------------------------|
| Tris              | 1 M            | 250 μL             | 25 mM                    |
| NaCl              | 5 M            | 200 μL             | 100 mM                   |
| MnCl <sub>2</sub> | 1 M            | 100 μL             | 10 mM                    |
| TX-100            | 100%           | 10 μL              | 0.1%                     |
| DTT               | 100 mM         | 50 μL              | 0.5 mM                   |

Una mezcla de buffer de cinasa de diez mililitros es suficiente para aproximadamente 12.5 placas de ensayo. Para hacer Buffer de cinasa, diluir

1.0 mL 10x de buffer de cinasa hasta alcanzar un volumen final de 8.0 mL con agua.

Las placas de polipropileno NUNC de 96 recipientes con fondo en forma de V (Applied Scientific, Catálogo # AS-72092) se usan para mezclar las drogas de prueba y los lisados.

Se prepara de la siguiente manera una solución madre de 500 mM de ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA): 1) Agregar aproximadamente 70 mL dH<sub>2</sub>O en un vaso de precipitados de 250 mL; 2) Agregar 14.12 g de EDTA; 3) Con una sonda de pH en el vaso de precipitados, agregar 10 N NaOH en gotas (el EDTA no se disolverá hasta que el pH sea de aproximadamente 7.0), y nótese que a medida que el EDTA se disuelve, el pH caerá, por ende es probable que se necesite agregar más NaOH; 4) Cuando todo el EDTA esté disuelto, ajustar el pH a 8.0; 5) Transferir a un cilindro graduado de 100 mL, llevar el volumen a 100 mL con dH<sub>2</sub>O. Para hacer una solución de trabajo de 200 mM agregar 30 mL dH<sub>2</sub>O a 20 mL 500 mM EDTA (anterior).

El suero anti-fosfotirosina policlonal de conejo se genera de acuerdo a lo descrito en *Methods of Enzymology*, 201:65-79 (1991), y se almacena a -80°C en alícuotas de 0.1 mL. El antisuero es estable durante varias semanas cuando se descongela y se almacena a 4°C. El conjugado de peroxidasa IgG anticonejo de cabra es un producto comercial (Biosource, Catálogo #AL10404).

El reactivo de revelado, que incluye 2,2 $\mu$ -azino-bis (ácido 3-etilbenztiazolin-6- sulfónico) (ABTS) (Sigma, Catálogo # A-1888) se prepara de la siguiente manera: Agregar aproximadamente 900 mL de dH<sub>2</sub>O a un cilindro graduado de 1 litro. Agregar 19.21 gramos de Acido Cítrico y 35.49 gramos de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y llevar el pH a 4.0 con ácido fosfórico. Agregar ABTS y cubrir con

una lámina. Dejar disolver durante aproximadamente 0.5 horas y filtrar la solución. Nótese que la solución debe mantenerse en la oscuridad a 4°C hasta que esté lista para usar.

La solución de peróxido de hidrógeno al 30% es un producto comercial de fácil obtención (Fisher, Catálogo # H325). Esta deberá almacenarse en la oscuridad a 4°C hasta que esté lista para usar.

Una formulación ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consiste en una solución de 15 mL ABTS (mencionada precedentemente) y 2 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Preparar 5 minutos antes de usar y dejar a temperatura ambiente. Tomar ABTS aproximadamente 60 minutos antes de usar y calentar hasta alcanzar la temperatura ambiente, o calentar rápidamente colocando el tubo en un baño de agua a 37°C. Agregar 3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes de usar.

Se preparan 0.2 M HCl mezclando 98.3 mL de dH<sub>2</sub>O con 1.7 mL de HCl. Esta solución se almacena a temperatura ambiente.

#### Procedimiento

Recubrir placas ELISA de 96 recipientes Corning con 0.5 µg por recipiente de anticuerpo 28D4C10 en un volumen de 100 µl PBS durante toda la noche, a 4°C y eliminar el anticuerpo no ligado, 28D4C10, de los recipientes mediante la inversión de la placa para eliminar el líquido. Lavar el lx con agua destilada llenando los recipientes. Secar suavemente la placa con toallas de papel Secar suavemente la placa con toallas de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 150 µL de buffer de bloqueo a cada recipiente. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando y lavar la placa 3x con agua

desionizada, luego una vez con TBST. Secar suavemente la placa con una toalla de papel para eliminar el líquido sobrante y las burbujas.

Diluir el lisado en PBS (10 mg lisado/100  $\mu$ L PBS). Agregar 100  $\mu$ L de lisado diluido en cada recipiente. Agitar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Lavar la placa 3x con agua desionizada, luego una vez con TBST. Secar suavemente la placa con una toalla de papel para eliminar el líquido sobrante y las burbujas.

Agregar 80  $\mu$ L de buffer de cinasa a una placa de ELISA que contenga PDGFR capturado.

Diluir drogas/extractos 1:10 (salvo especificación en contrario) en TBS + 10% DMSO en 96-well placas de polipropileno. (i.e., 10  $\mu$ L compuesto +90  $\mu$ L (TBS + 10% DMSO)). Agregar 10  $\mu$ L drogas/extractos diluidos a una placa de ELISA. A los recipientes de control (recipientes que no recibieron ninguna droga) agregar 10  $\mu$ L de TBS +10% DMSO. Incubar durante 30 minutos mientras se agita a temperatura ambiente.

Agregar 10  $\mu$ L 25  $\mu$ M ATP directamente a todos los recipientes excepto el control negativo que no recibe ATP. (100  $\mu$ L volumen final en el recipiente con 2.5  $\mu$ M de ATP concentración final en el recipiente.) Incubar 30 minutos mientras se agita.

Luego de 30 minutos detener la reacción mediante el agregado de 10  $\mu$ L de 200 mM EDTA pH 8.0 para 20 mM final en el recipiente. Lavar 4x con agua desionizada, dos veces con TBST.

Agregar 100  $\mu$ L por recipiente de mAb de anti-fosfotirosina (dilución 1:10,000 en TBST). Incubar 30-45 minutos a temperatura ambiente, mientras se agita. Lavar la placa 3x con agua desionizada, luego una vez con TBST.

Secar suavemente la placa con una toalla de papel para eliminar el líquido sobrante y las burbujas.

Agregar 100 µL por recipiente de conjugado de peroxidasa IgG anticonejo de cabra de origen biológico (dilución 1:6,000 en TBST). Incubar 30 minutos a temperatura ambiente mientras se agita. Lavar la placa 3x con agua desionizada, luego una vez con TBST. Secar suavemente la placa con una toalla de papel para eliminar el líquido sobrante y las burbujas.

Agregar 100 µL de solución ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cada recipiente. Incubar 10 a 30 minutos mientras se agita. Eliminar todas las burbujas. Si es necesario detener la reacción con el agregado de 100 µL de 0.2M HCl por recipiente

Leer el ensayo con un lector Dynatech MR7000 ELISA. Filtro de Prueba: 410 nM; Filtro de Referencia: 630 nM.

A continuación se ofrece una plantilla preferida para la ubicación de los controles en este experimento:

|   | 1   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12  |
|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|-----|
| A | POS |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | NEG |
| B | POS |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | NEG |
| C | POS |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | NEG |
| D | POS |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | NEG |
| E | NEG |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | POS |
| F | NEG |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | POS |
| G | NEG |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | POS |
| H | NEG |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | POS |

**5.57. EJEMPLO 57: ENSAYO PARA LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GST-FLK1**

Usando los siguientes reactivos, suministros, y método, se puede asignar la capacidad de compuestos de la invención para afectar la actividad in vitro de Gs $\alpha$ -Flk1 en el ácido poliglutámico, péptido de tirosina (pEY) en un ensayo de rastreo de alto rendimiento.

#### Reactivos y Suministros

Los ensayos se realizan en placas ELISA Coming de 96 recipientes (Coming, Catálogo # 25805-96), usando el pEY 4:1, liofilizado (Sigma, Catálogo # P0275) como un sustrato para FLK1. Preparar 1 mg/mL pEY en PBS estéril y almacenar en alícuotas de 1 mL a -20°C.

Recubrir un recipiente con 2  $\mu$ g/ de pEY en 100  $\mu$ L PBS a temperatura ambiente durante 2 horas a 4°C durante toda la noche. Cubrir bien las placas para evitar la evaporación. Almacenar a 4°C durante 7 a 10 días.

El buffer de PBS se prepara agregando a un cilindro graduado de 1 litro, aproximadamente 900mL dH<sub>2</sub>O y 0.2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.15g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g de KCl, y 8.0g de NaCl. Cuando todos los reactivos se han disuelto, llevar el pH a 7.2 con HCl, y llevar el volumen a 1 litro dH<sub>2</sub>O. Se puede hacer una solución madre 10x multiplicando las cantidades por 10 (pero manteniendo el volumen final de 1 litro). Esta solución madre luego se diluye 10 veces con dH<sub>2</sub>O y su pH se ajusta a 7.2. Nótese que la PBS puede mantenerse a temperatura ambiente, pero se almacena mejor a 4°C.

El buffer PBS-Tw se prepara como se indicó más arriba, excepto que antes de llevar el volumen a 1 litro, se agrega 1 mL de tween-20. Nótese que PBS-Tw puede dejarse a temperatura ambiente, pero se prefiere 4°C como temperatura de almacenamiento.

El buffer de bloqueo TBB se prepara agregando a un vaso de precipitados graduado de 1 litro, aproximadamente 900 mL dH<sub>2</sub>O 1.21g de Tris, 8.77g de NaCl, y 1 mL de Tween-20. Cuando todos los reactivos se han disuelto, llevar el pH a 7.2 con HCl. Luego, agregar 10g de BSA, y agitar hasta que se disuelva. Llevar el volumen a 1 litro con dH<sub>2</sub>O y filtrar la solución para eliminar cualquier materia particulada, antes de almacenar a 4°C. Se puede hacer una solución madre de 10x multiplicando las cantidades por 10 (pero manteniendo el volumen final de 1 litro). Esta solución madre luego se diluye 10 veces con dH<sub>2</sub>O. Filtrar la solución para eliminar toda materia particulada, y almacenar a 4°C. Nótese que cuando está almacenada a 4°C, esta solución es estable durante aproximadamente 4 a 8 semanas.

Se prepara una solución PBS + 1% BSA agregando a un vaso de precipitados graduado de 1 litro aproximadamente 990 mL PBS. Luego, se agregan 10 gramos de BSA y se agita hasta que se disuelva. Llevar el volumen a 1 litro con PBS y filtrar la solución para eliminar toda materia particulada, antes de almacenar a 4°C. Nótese que cuando está almacenada a 4°C, esta solución es estable durante aproximadamente 4 a 8 semanas.

El buffer HEPES es un producto comercial (GIBCO, Catálogo #15630-080).

El GST-FIk1cd se purifica a partir de la transformación del baculovirus recombinante sf9 y se almacena a -80°C en alícuotas de 100 µL (usar 5 ng (0.005 µg) por recipiente en buffer de dilución de cinasa, KDB). La transformación se prepara de acuerdo a lo siguiente. La proteína de fusión con GST de FIk-1(cd) se produce en el sistema de expresión del baculovirus usando pFBG2T como vector de transferencia. Este plásmido contiene la

secuencia de codificación GST, amplificada por PCR como un fragmento de *Bam* HI/*Bgl* II y clonada en el sitio *Bam* HI de pFastBac-1 (GIBCO-BRL). La porción de ADNc Flk-1 que codifica los aminoácidos 812-1346 se amplifica mediante PCR como un fragmento *Not* I/*Sph* I y se liga hacia abajo de y dentro del marco con la secuencia de codificación GST en pFBG2T. Los virus recombinantes se producen siguiendo los protocolos normales (GIBCO-BRL, FastBac manual). Para la producción de proteínas las células Sf9 se infectan siguiendo los procedimientos normales (King, L. A. y Possee, R. D. "The Baculovirus Expression System. A Laboratory Guide," Chapman y Hall, London (1992)) y las proteínas de fusión se purifican mediante cromatografía por afinidad en sefarosa glutationa (Sigma).

Se prepara una solución de dH<sub>2</sub>O + 4% DMSO mezclando 10 mL de DMSO con 240 mL dH<sub>2</sub>O y agitando.

Se prepara adenosina-5'-trifosfato (de músculo equino) 10 mM ATP (Sigma, Catálogo # A-5394) agregando 5 mL de dH<sub>2</sub>O a 27.5 mg ATP mediante vórtex. Nótese que se puede usar cualquier cantidad de ATP a condición de que se mantenga en la misma relación de ATP a dH<sub>2</sub>O. Nótese también que este reactivo puede almacenarse a -20°C en pequeñas alícuotas que deben tomarse inmediatamente antes de usar y mantenerse sobre hielo. No congelar/ni descongelar las alícuotas; descartar toda porción no utilizada.

Se prepara una solución madre de 1 M MnCl<sub>2</sub> agregando 19.79 gramos de MnCl<sub>2</sub> a 10 mL de dH<sub>2</sub>O y agitando. Una vez que se ha disuelto el MnCl<sub>2</sub>, filtrar, esterilizar y almacenar a -20°C. Se prepara una solución de trabajo de 40 mM MnCl<sub>2</sub> mezclando 96 mL de dH<sub>2</sub>O y 4 mL de MnCl<sub>2</sub> de la solución madre de 1 M inmediatamente antes de usar.

Cien mL de mezcla de buffer de cinasa son suficientes para aproximadamente 40 placas de ensayo. El buffer de dilución de cinasa (KDB) se prepara mezclando 88.56 mL de dH<sub>2</sub>O con 10 mL de 1M Hepes pH 7.5, 1 mL de 5M NaCl, 40ml de vanadato sódico 100 mM y 0.4 mL de BSA 5% (en dH<sub>2</sub>O).

Cien mL de mezcla de buffer de cinasa son suficientes para aproximadamente 40 placas de ensayo. Los ensayos de cinasa se realizan en placas de polipropileno NUNC de 96 recipientes con fondo en forma de V (Applied Scientific, Catálogo # AS-72092).

El ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) se prepara como en el Ejemplo 56.

El buffer de dilución del 1° y 2° anticuerpo se prepara mezclando 89.5 mL de PBSTw con 0.5 mL de leche en PBS, 1 mL de vanadato sódico 10 mM y 10 mL de BSA 5% en PBS.

Los antisueros policlonales de conejo anti-fosfotirosina y el conjugado HRP anticonejo de cabra son productos comerciales (Biosource, Catálogo #A110404).

La solución ABTS se prepara como en el Ejemplo 56.

Solución de peróxido de hidrógeno 30% (Fisher, Catálogo # H325). Almacenar en lugar oscuro a 4°C hasta que esté lista para usar.

La ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se prepara como en el Ejemplo 56. Tomar ABTS aproximadamente 60 minutos antes de usar y calentar a temperatura ambiente, o calentar rápidamente colocando el tubo en un baño de agua a 37°C. Agregar 3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes de usar.

0.2 M HCl como se describió precedentemente y almacenar a temperatura ambiente.

#### Procedimiento

Recubrir placas ELISA de 96 recipientes Coming con 2 µg de polyEY péptido en PBS estéril. Eliminar el líquido no unido de los recipientes invirtiendo la placa. Lavar la 1x TBSTw. Secar suavemente la placa con toallas de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 100 µL de 1% BSA en PBS a cada recipiente. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras se agita. Repita el paso de eliminación del líquido no unido de los recipientes invirtiendo la placa. Lavar la 1x TBSTw. Secar suavemente la placa con toallas de papel para eliminar el líquido sobrante.

Remojar los recipientes con 50 mM Hepes pH 7.5 usando 150 µL por recipiente.

Diluir las drogas con los extractos a 4x de la concentración final deseada del ensayo en dH<sub>2</sub>O + 4% DMSO (salvo especificación en contrario) en placas de polipropileno NUNC de 96 recipientes. Agregar siempre el mayor volumen de agua al menor volumen de compuesto para asegurar una rápida mezcla. Agregar 25 µL drogas/extractos diluidos a la placa ELISA. A los recipientes de control (recipientes que no reciben ninguna droga) agregar 25 µL de dH<sub>2</sub>O +4% DMSO.

Diluir GST-Fikl 0.005 µg (5 ng) por recipiente en KDB. Para 50 mL KDB agregar 100 µL de enzima GST-Fikl 0.050 mg/mL. Esto es suficiente para una placa de ensayo 10. Agregar 50 µL de enzima diluida a cada recipiente. Agregar 25 µL 0.5 M EDTA a los recipientes de control negativos.

Agregar 25  $\mu$ L de 40 mM  $MnCl_2$  con 4x ATP (2  $\mu$ M) directamente a todos los recipientes (100  $\mu$ L volumen final en recipiente con 0.5  $\mu$ M ATP de concentración final en recipiente.) Incubar durante 15 minutos mientras se agita a temperatura ambiente. Luego de 15 minutos detener la reacción con el agregado de 25  $\mu$ L de 500 mM EDTA pH 8.0 para 50 mM final en el recipiente. Lavar el 3x con TBSTw y secar suavemente con toalla de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 100  $\mu$ L por recipiente de antisueros anti-fosfotirosina (dilución 1:10,000 en buffer de dilución de anticuerpo). Incubar 90 minutos a temperatura ambiente, mientras se agita. Lavar el 1x con TBSTw y secar suavemente con toalla de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 100  $\mu$ L por recipiente de conjugado HRP de anticonejo de cabra (dilución 1:6,000 en buffer de dilución de anticuerpo). Incubar 90 minutos a temperatura ambiente mientras se agita. Lavar el 3x TBSTw. Secar suavemente la placa con toallas de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 100  $\mu$ L a temperatura ambiente. ABTS/ $H_2O_2$  solución a cada recipiente. Incubar 15 a 30 minutos mientras se agita. Eliminar todas las burbujas. Si es necesario detener la reacción con el agregado de 100  $\mu$ L de 0.2M HCl por recipiente.

Leer el ensayo con un lector Dynatech MR7000 ELISA : Filtro de Prueba: 410 nM; Filtro de Referencia: 630 nM. En el ejemplo 56 precedente se proporciona una plantilla preferida para la ubicación de los controles en este experimento.

#### **5.58. EJEMPLO 58: ENSAYO PARA LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD HER-2**

Usando los siguientes reactivos, suministros, y método, se puede asignar la capacidad de los compuestos de la invención para afectar la actividad de HER-2 en células completas en un formato ELISA.

#### **Materiales y Reactivos**

##### **Cultivo de tejidos**

Los medios de cultivo líquidos, DMEM, (GIBCO, Catálogo #11965-092), y el Suero Bovino Fetal inactivado (FBS), (GIBCO, Catálogo #16000-044) son productos comerciales. Trypsin, (GIBCO, Catálogo #25200-056), L-Glutamina almacenados en alícuotas de 6 mL a -20°C (GIBCO, Catálogo #25030-081), y HEPES, (GIBCO, Catálogo #15630-080) también son productos comerciales.

Los medios de crecimiento se preparan agregando a una botella de 500 mL de DMEM, FBS inactivado por calor al 10% FBS (55 mL), 10 mL HEPES y 5.5 mL L-Glutamina. Los medios de agotamiento se preparan agregando a una botella de 500 mL de DMEM, FBS inactivado por calor al 0.5% (2.5 mL), 10 mL HEPES y 5.5 mL L-Glutamina.

Las placas de fondo plano de 96 recipientes para microtítulo de cultivo, (Corning, Catálogo #25860), platos de cultivo de tejido de 15 cm, (Corning, Catálogo #08757 148), placas Corning de 96 recipientes para ELISA, (Corning, Catálogo # 25805-96), placas de polipropileno NUNC de 96 recipientes con fondo en forma de V (Applied Scientific, Catálogo #AS-72092), y cartuchos Costar Transfer para el Transtar 96, Catálogo #76 10 son todos productos comerciales.

SUMO1 es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR. Más específicamente, SUMO1 es anticuerpo monoclonal anti-EGFR derivado de ascitis producido por el clon híbrido mAb108 (PNAS 86: 925-929 (1989)). El anticuerpo se

purifica por medios convencionales usando proteína A-agarosa de acuerdo a lo descrito (Harlow, E. y Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

La PBS (GIBCO, Catálogo # 450-1300EB), se compra a un proveedor o se prepara de acuerdo a lo descrito en el Ejemplo 58.

El buffer de TEST se prepara en una solución madre agregando 6.057 gramos de Tris, y 8.766 gramos de NaCl a 900 mL de dH<sub>2</sub>O y pH a 7.2. Luego se agrega 1 mL de Triton X-100 al dH<sub>2</sub>O y la mezcla se lleva a 1L con dH<sub>2</sub>O.

El buffer de bloqueo al 5% se prepara pesando 5 gramos de leche descremada instantánea y volcando 100 mL de TEST (ver más arriba) en un vaso de precipitados limpio. Luego agregar la leche instantánea a TEST, agitar a temperatura ambiente hasta que la leche se haya disuelto. Nótese que cuando está almacenada a 4°C, esta solución es estable durante 1 a 2 semanas.

El ligando EGF: EG.-201, (Shinko American, Japan) es un producto comercial. Almacenar los frascos de polvo a (100 µg/frasco) a 4°C.

El ligando EGF en una concentración de solución madre 16.5 µM se prepara volviendo a suspender todo el polvo en el frasco con 100 µL de 10mM HCl y agregando 100 µL de 10 mM NaOH. Luego agregar 800 µL de PBS al frasco y transferir a un tubo Eppendorf para su almacenamiento a -20°C. Nótese que para obtener óptimos resultados, completar un frasco EGF inmediatamente antes de usar. El EGF resuspendido por lo general es estable a -20°C durante varias semanas.

Se prepara una solución madre de buffer de lisis 5x HNTG mezclando 23.83 gramos de HEPES y 43.83 gramos de NaCl en 350 mL de dH<sub>2</sub>O. La

mezcla se lleva a pH 7.2 y se agregan 500 mL de glicerol y 100 mL de Triton X-100. El volumen se lleva a 1L con dH<sub>2</sub>O, y se agita con los reactivos.

Se prepara buffer de 1x HNTG\* mezclando 2 mL de HNTG con 100  $\mu$ L de 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 240  $\mu$ L de 25 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y 100  $\mu$ L de 5 mM EDTA. La mezcla se lleva a 10 mL con dH<sub>2</sub>O.

Preparar EDTA de acuerdo a lo descrito en el Ejemplo 56.

Se prepara 0.1 M de una solución madre de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> agregando aproximadamente 90 mL de dH<sub>2</sub>O a un vaso de precipitados de 250 mL y agregando luego Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Con el pH colocar sonda en el vaso de precipitados, pH a 10 (se vuelve naranja) y luego hacer hervir mediante microondas durante aproximadamente 1 minuto (la solución se aclara). Enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y colocar en un baño de agua. Verificar el pH y llevar a un pH de 10 antes de hervir y enfriar hasta que el pH permanezca en 10. Usar HCl o NaOH para ajustar pH y hacer alícuotas de 1 mL para mantener a -80°C.

Se preparan 0.2 M de una solución madre Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Fisher, Catalogue # 5390) agregando 8.92 gramos a 100 mL de dH<sub>2</sub>O. Filtrar la solución antes de usar.

Se genera antisuero policlonal de conejo específico para fosfotirosina (anticuerpo anti-Ptyr) de acuerdo a lo descrito por *Methods of Enzymology*, 201:65-79 (1991).

El antisuero purificado por afinidad, el anticuerpo IgG anti-conejo de cabra, el conjugado de peroxidasa es un producto comercial (Biosource antibody Cat # ALI0404).

La solución ABTS se prepara como en el Ejemplo 56.

Solución de peróxido de hidrógeno 30% (Fisher, Catálogo # H325). Almacenar en lugar oscuro a 4 °C hasta que esté lista para usar.

Se prepara ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como en el Ejemplo 56. Tomar ABTS aproximadamente 60 minutos antes de usar y calentar a temperatura ambiente o calentar rápidamente colocando el tubo en un baño de agua a 37°C. Agregar 3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes de usar.

Almacenar a temperatura ambiente 0.2 M HCl como se describió precedentemente.

#### Procedimiento

##### A. Pre-recubrimiento de la placa ELISA

Recubrir las placas ELISA de 96 recipientes Corning con SUMOI en 1.0 µg por recipiente en PBS, 100 µL volumen final por recipiente, durante toda la noche a 4 °C. Las placas revestidas se mantienen en buen estado hasta 10 días cuando están almacenadas a 4°C. Si es necesario, las placas pueden recubrirse a temperatura ambiente durante dos horas mientras se agitan.

El día que se han de utilizar, eliminar el buffer de cubierta y lavar la placa 3 veces con agua desionizada y una vez con buffer TEST. Nótese que todos los lavados deben hacerse de esta forma, salvo especificación en contrario. Agregar 100 µL de buffer de bloqueo a cada recipiente. Incubar la placa, agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Inmediatamente antes de usar, lavar la placa como se describió precedentemente.

##### B. Sembrado de células

Para este ensayo se usan las líneas de células EGFR/HER-2chimera/HT3-C7. Elegir platos que tengan 80-90 % de confluencia para este

experimento. Recoger las células mediante tripsinización y centrifugar a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Volver a suspender las células en medio de agotamiento y contar con trypan azul. Sólo se acepta una viabilidad del 90 %. Sembrar las células en medio de agotamiento a una densidad de 2,500 células por recipiente, 90  $\mu$ L por recipiente, en una placa microtítulo de 96 recipientes. Incubar las células sembradas en 5 %  $\text{CO}_2$  a 37°C durante toda la noche. Iniciar el ensayo dos días después de sembrar.

### C. Procedimientos de ensayo

#### Rastreo Primario

Las muestras se diluyen directamente en una placa de polipropileno que contiene DMEM de agotamiento (no-estéril es correcto). Esta dilución será de 1:10 o mayor, dependiendo de las muestras que se han rastreado. En los recipientes de control se coloca la misma cantidad de DMSO. Todas las células se transfieren entonces a la placa de células a una dilución de 1:10 (10  $\mu$ L de la muestra y los medios en 90  $\mu$ L de medios de agotamiento). La concentración final de DMSO será de 1% o inferior.

#### Rastreo Secundario

Se colocan diez muestras en los recipientes 2-11 de la fila A de la placa de polipropileno NUNC de 96 recipientes. Estos recipientes contienen DMEM de agotamiento directo. Para una dilución de 1:10, se pondrían 10  $\mu$ L de droga en 90  $\mu$ L de medio. El resto de los recipientes (incluyendo los de control) tendrán una mezcla de DMSO/medio. El porcentaje de DMSO en esta mezcla se determina por el primer factor de dilución, en este caso 1:10. La concentración de DMSO es por lo tanto de 10%. Una cantidad igual de droga y medio de la

fila A se coloca en la fila B, con DMSO y medio. La misma cantidad luego se extrae y se coloca en la fila C. Esto se repite para todas las hileras. Se trata de diluciones 1:2. Como los recipientes luego son transferidos a la placa de células a una dilución de 1:10 (10  $\mu$ L de muestra y medio en 90  $\mu$ L de DMEM de agotamiento. La concentración final de DMSO será de 1% o inferior. Incubar en 5 %  $\text{CO}_2$  a 37°C durante 2 horas y en el período de incubación, preparar ligando diluyendo solución madre EGF (16.5  $\mu$ M) en DMEM caliente (no estéril es correcto) hasta 150 nM y preparar HNTG\* fresco suficiente para 100  $\mu$ L por recipiente y colocar sobre hielo.

Luego de 2 horas de incubación con la droga, agregar ligando EGF preparado a las células a 50  $\mu$ L por recipiente, para obtener una concentración final de 50 nM. Los recipientes de control positivo (8) reciben la misma cantidad de EGF. Los controles negativos no reciben. Incubar a 37°C durante 10 minutos.

Eliminar la droga, EGF, y DMEM volcando en una pileta. Lavar las células una vez con PBS.

Transferir HNTG\* a las células, 100  $\mu$ L por recipiente. Colocar en hielo durante 5 minutos. Mientras tanto, eliminar el buffer de bloqueo de la placa para ELISA y lavar como se describió precedentemente. Con una punta de una pipeta colocada en forma segura en una micropipeta, raspar las células de la placa y homogeneizar el material celular aspirando y emitiendo repetidas veces el buffer de lisis HTNG\*. Transferir el lisado a una placa para ELISA revestida, bloqueada y lavada. Alternativamente, se puede usar un cartucho de transferencia Costar para transferir lisado a la placa de ELISA. Incubar, agitar, a temperatura ambiente durante una hora.

**Leer el ensayo con un lector Dynatech MR7000 ELISA . Filtro de Prueba: 410 nM; Filtro de Referencia: 630 nM. A continuación se ofrece una plantilla preferida para la ubicación de los controles en este experimento:**

[illegible]

**5.59. EJEMPLO 59: ENSAYO PARA LA INHIBICIÓN DE CDK2**

Usando los siguientes reactivos, suministros, y método, se puede asignar la capacidad de los compuestos de la invención para ensayar para la modulación de la actividad de la cinasa in vitro de la cdk2/cyclin A humana en una Ensayo de Proximidad de Centelleo (SPA).

**Reactivos y Suministros**

Se realizan ensayos en placas (flexi) de polietilén tereftalato de Wallac con 96 recipientes (Wallac, Catálogo # 1450-401). Amersham Redivue [ $\mu^{33}\text{P}$ ] ATP (Amersham, Catálogo #AH 9968).

Las perlas para el ensayo son perlas SPA de poliviniltolueno recubiertas con estreptavidina Amersham (Amersham, Catálogo #RPNQ0007). Reconstituir las perlas en PBS sin magnesio o calcio, en 20 mg/ mL. Almacenar las perlas reconstituidas a 4°C.

El complejo de enzima A cdk2/ciclina activada se purifica a partir de células Sf9 y se almacena a -80°C en alícuotas de 200  $\mu\text{L}$ . La proteína cdk2/ciclina A humana se expresa, activa y purifica a partir de células sf9 infectadas con baculovirus como se describió precedentemente. (*J. Mol. Biol.*, 230:1317-1319 (1993)).

El sustrato es un sustrato de péptido biotinilado (Debtide), que es un péptido biotin-X-PKTPKKAKKL disuelto en  $\text{dH}_2\text{O}$  a una concentración de 5 mg/ mL y almacenado a -80°C en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$ .

La mezcla de Péptido/ATP se prepara mezclando 9.979 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  con 0.00125 mL de 10 mM ATP frío, 0.010 mL de 5mg/mL de Debtide, y 0.010 mL de 10  $\mu\text{Ci/mL}$   $\mu^{33}\text{P}$  ATP.

Se prepara un buffer de cinasa 2.5x mezclando 8.85 mL de dH<sub>2</sub>O con 0.625 mL de 1M Tris pH 7.4, 0.25 mL de 1M MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mL de 10% NP40, y 0.025 mL de 1M DTT. Una mezcla de diez mililitros de buffer de cinasa es suficiente para aproximadamente 4.5 placas de ensayo.

La adenosina-5'-trifosfato 10 mM (de músculo equino) ATP (Sigma, Catálogo #A-5394) se prepara como en el Ejemplo 57. Nótese que este reactivo puede ser almacenado a -20°C en pequeñas alícuotas para ser tomadas inmediatamente antes de usar y mantenidas sobre hielo. No congelar/descongelar las alícuotas; descartar toda porción no utilizada.

La PBS (solución salina de buffer de fosfato Dulbeccoys) sin magnesio o calcio (Gibco, Catálogo # 14 190-144) se compra en un proveedor comercial o se prepara como en el Ejemplo 57 y se prepara una solución madre de 500 mM EDTA como en el Ejemplo 56.

Antes del experimento, preparar la siguiente solución madre:

| Reactivo    | Solución Madre | Monto por 10 mL | Concentración de trabajo   |
|-------------|----------------|-----------------|----------------------------|
| PBS         |                | 9.25 mL         |                            |
| ATP         | 100 mM         | 0.005 mL        | 50 µM                      |
| EDTA        | 0.5 M          | 0.1 mL          | 5 mM                       |
| TritonX-100 | 10%            | 0.1 mL          | 0.1%                       |
| Perlas SPA  | 20 mg/mL       | 1.25 mL         | 0.5 mg/recipiente (200 µL) |

Procedimiento

Preparar soluciones de inhibidores a 5x la concentración final deseada en 5% DMSO. Agregar 10  $\mu$ L a cada recipiente. Para los controles negativos, agregar 10  $\mu$ L 5% DMSO.

Diluir una solución de 5  $\mu$ L de cdk2/ciclina A en 2.1 mL 2x de buffer de cinasa (por placa) y agregar 20  $\mu$ L de enzima por recipiente. Esta puede agregarse usando una pipeta manual o usando el Titertek Multidrop. Nótese que la enzima puede ser congelada/descongelada, pero esto da como resultado la pérdida de cierta actividad. Para cada ciclo de congelamiento/descongelamiento, duplicar la cantidad de enzima usada en el ensayo. Además, la enzima debería ser descongelada rápidamente (e.g., en la palma de la propia mano) y ser mantenida sobre hielo antes de usar en el ensayo. Agregar 10  $\mu$ L de 0.5 M EDTA a los recipientes de control negativos.

Para comenzar con la reacción de cinasa, agregar 20  $\mu$ L de mezcla de péptido/ATP usando una pipeta manual o bien el Titertek Multidrop. Dejar reposar en una mesada tras de una protección durante una hora. No es necesario agitar y no se lo recomienda al usar Flexiplates (placas que no son fáciles de agregar/retirar del agitador).

Agregar 200  $\mu$ L de solución stop por recipiente usando el Titertek Multidrop o bien una pipeta manual. Dejar reposar durante por lo menos 10 minutos. Hacer girar la placa a velocidad, aproximadamente a 2300 rpm durante 3-5 minutos. Contar las placas en un lector Trilux.

En el Ejemplo 56 precedente se mostraba una plantilla preferida para la ubicación de los controles en este experimento.

#### **5.60 EJEMPLO 60: ENSAYO PARA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EGFR**

Usando los siguientes reactivos, suministros, y método, capacidad de los compuestos de la invención para modular la actividad in vitro de EGFR puede ser fácilmente determinada en un ELISA.

#### Reactivos y Suministros

Las reacciones se realizan en placas Corning de 96 recipientes para ELISA (Corning, Catálogo # 25805-96).

El SUMO1 es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR almacenado a -20°C, en alícuotas de 1 mL y está descrito en el Ejemplo 58.

La PBS (Gibco, Catálogo # 450-1300EB) se compra en un proveedor comercial o se hace de acuerdo a lo descrito en el Ejemplo 56.

El buffer TBS se prepara como en el Ejemplo 56, y se agrega Triton X-100 hasta un 0.1%

El buffer de bloqueo se prepara como en el Ejemplo 57.

El lisado de células de ratón A431 se almacena a -80°C (ATCC, Catálogo #HB-9629).

TBS +10% DMSO se prepara como en el Ejemplo 56.

Se preparan una solución madre 1.0 mM ATP y una solución madre 1M  $\text{MnCl}_2$  como se describió precedentemente.

Se prepara una mezcla de fosforilación de ATP/ $\text{MnCl}_2$  agregando 300  $\mu\text{L}$  de 1.0 mM ATP y 500  $\mu\text{L}$  de 1M  $\text{MnCl}_2$  a 9.2 mL de  $\text{dH}_2\text{O}$  y mezclando. Diez mL de mezcla de fosforilación es suficiente para aproximadamente 6 placas de ensayo. Nótese que la mezcla deberá estar fresca y mantenerse sobre hielo inmediatamente antes de usar, y que si bien el ATP preferido es fresco a partir de solución madre en polvo, toda solución madre de ATP

restante puede ser congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  en pequeñas alícuotas para ser usadas en un momento posterior.

Las placas de polipropileno NUNC de 96 recipientes con fondo en forma de V se usan para las reacciones, (Applied Scientific, Catálogo # AS-72092).

EDTA se prepara de acuerdo a lo descrito en el Ejemplo 56.

El suero anti-fosfotirosina policlonal de conejo se prepara como se describió precedentemente y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en alícuotas de 1 mL. Descongelar un frasco de 1 mL y dividir en alícuotas en volúmenes más pequeños para almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El antisuero es estable durante varias semanas cuando se descongela y se almacena a  $4^{\circ}\text{C}$ . El conjugado de peroxidasa de IgG de anticonejo (Biosource, Catálogo # ALI0404) es un producto comercial.

La solución ABTS se prepara de acuerdo a lo descrito en el Ejemplo 56.

La solución de peróxido de hidrógeno 30% es un producto comercial (Fisher, Catálogo # H325). Almacenar en lugar oscuro a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta que esté listo para usar.

ABTS/ $\text{H}_2\text{O}_2$  se prepara como en el Ejemplo 56.

Tomar ABTS aproximadamente 60 minutos antes de usar y calentar a temperatura ambiente o calentar rápidamente colocando el tubo en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ . Agregar 3  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  antes de usar.

0.2 M HCl como se describió precedentemente y almacenar a temperatura ambiente.

#### Procedimiento

Recubrir placas ELISA de 96 recipientes Corning con 0.5  $\mu\text{g}$  por recipiente con SUMOI en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  PBS durante toda la noche, a

4°C. Eliminar el SUMOI no ligado de los recipientes invirtiendo las placas para sacar el líquido. Lavar la lx con agua destilada llenando los recipientes. Secar suavemente la placa con toallas de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 150  $\mu\text{L}$  de buffer de bloqueo a cada recipiente. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, mientras se agita. Lavar la placa 3x con agua desionizada, luego una vez con TBST. Secar suavemente la placa con una toalla de papel para eliminar el líquido sobrante y las burbujas.

Diluir el lisado en PBS (7  $\mu\text{g}$  lisado/100  $\mu\text{L}$  PBS) y agregar 100  $\mu\text{L}$  de lisado diluido a cada recipiente. Agitar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Lavar la lx con agua destilada llenando los recipientes. Secar suavemente la placa con toallas de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 120  $\mu\text{L}$  TBST a una placa para ELISA que contenga EGFR capturado.

Diluir drogas/extractos 1:10 (salvo especificación en contrario) en TBST en placas de polipropileno de 96 recipientes. (i.e., 10  $\mu\text{L}$  compuesto + 90  $\mu\text{L}$  TBST). Agregar 13.5  $\mu\text{L}$  de drogas/extractos diluidos a una placa para ELISA. A los recipientes de control (recipientes que no recibieron ninguna droga) agregar 13.5  $\mu\text{L}$  de TBST + 10% DMSO. Incubar durante 30 minutos mientras se agita a temperatura ambiente.

Agregar 15  $\mu\text{L}$  de mezcla de fosforilación directamente a todos los recipientes excepto el recipiente de control negativo que no recibe ATP/ $\text{MnCl}_2$ . Aproximadamente 150  $\mu\text{L}$  volumen final en recipiente con una concentración final de 3  $\mu\text{M}$  ATP/5 mM  $\text{MnCl}_2$  en recipiente. Incubar 5 minutos mientras se agita. Nótese que este es un evento con tiempo medido. Es esencial que ATP/ $\text{MnCl}_2$  fosforile al receptor durante apenas 5 minutos. Es mejor agregar el

ATP/MnCl<sub>2</sub> con una estación de trabajo automatizada de 96 lugares de minipipeta, luego 5 minutos más tarde detener la reacción con EDTA usando la misma estación de trabajo. Alternativamente, se puede realizar la adición usando un a minipipeta de 12 canales, una fila por vez, dejando 20 segundos entre cada fila de manera que la reacción pueda detenerse con EDTA exactamente 5 minutos más tarde (esto depende de la cantidad de placas que se estén fosforilando en un lote). Agitar entre cada agregado.

Luego de 5 minutos, para detener la reacción, agregar 16.5 µL de 200 mM EDTA pH 8.0 para 20 mM final en recipiente, agitando continuamente entre cada agregado. Esto se hace usando la misma estación de trabajo precedente o bien el mismo método de medición del tiempo empleado con la minipipeta de 12 canales. Luego de que se ha agregado el EDTA, agitar durante 1 minuto. Lavar la 4x con agua desionizada, dos veces con TBST.

Agregar 100 µL por recipiente de anti-fosfotirosina (dilución 1:3000 en TBST). Incubar 30-45 minutos a temperatura ambiente, mientras se agita. Lavar la 1x con agua destilada llenando los recipientes. Secar suavemente la placa con toallas de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 100 µL por recipiente de conjugado de peroxidasa IgG anticonejo de cabra de origen biológico (dilución 1:2000 en TBST). Incubar 30 minutos a temperatura ambiente, mientras se agita. Lavar la 1x con agua destilada llenando los recipientes. Secar suavemente la placa con toallas de papel para eliminar el líquido sobrante.

Agregar 100 µL de ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solución a cada recipiente. Incubar 5 a 10 minutos mientras se agita. Eliminar todas las burbujas. Si es necesario detener la reacción con el agregado de 100 µL de 0.2M HCl por recipiente

Leer el ensayo con un lector Dynatech MR7000 ELISA . Filtro de Prueba: 410 nM; Filtro de Referencia: 630 nM. En el Ejemplo 56 precedente se ofrece una plantilla preferida para la ubicación de los controles en este experimento.

**5.61. EJEMPLO 61: INHIBICIÓN DE CINASA DE COMPUESTOS SELECCIONADOS**

Usando métodos como los descritos precedentemente, la capacidad de los compuestos seleccionados de la invención para inhibir la actividad de las cinasas FikGST, EGFR, PDGFR, cdk2SPA, y HER-2 se consigna a continuación:

| Formula del Compuesto | bio FikGST IC50 (µM) | bio EGFR IC50 (µM) | bio PDGFR IC50 (µM) | cdk2SPA IC50 (µM) | HER-2 cinasa IC50 (µM) |
|-----------------------|----------------------|--------------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| 3                     | 0.06                 | 0.51               | >100                | >10               | 0.272                  |
| 4                     | 0.33                 | 0.006              | >100                | >10               | 0.16                   |
| 5                     | >20                  | >20                | >100                |                   | 81.16                  |
| 6                     | 3.31                 | 0.001              | >100                |                   | 0.13                   |
| 7                     | 3.24                 | 0.16               | 85.96               |                   | 0.04                   |
| 8                     | 15.93                | 0.06               | 16.39               | 2.62              | 0.1                    |
| 9                     | 16.49                | 0.04               | >100                |                   | 0.01                   |
| 10                    | >20                  | >20                | >100                |                   | >100                   |
| 11                    | >20                  | >20                | 28.14               | 0.01              | >100                   |
| 12                    | 0.78                 | 0.004              | >100                |                   | 0.28                   |
| 13                    | >20                  | 19.07              | >100                |                   | >100                   |
| 14                    | >20                  | >20                | >100                | 0.04              | >100                   |

|    |       |       |       |  |       |
|----|-------|-------|-------|--|-------|
| 15 | >20   | 0.02  | >100  |  | 0.13  |
| 16 | 9.28  | 0.1   | >20   |  | 1.02  |
| 17 | 16.22 | 0.02  | >20   |  | 0.1   |
| 18 | 4.18  | 0.18  | 15.29 |  | 0.03  |
| 19 | 1.05  | 0.17  | 12.75 |  |       |
| 24 | 2.73  | 0.89  | >20   |  |       |
| 25 | 5.12  | 0.058 |       |  | 11.92 |
| 26 | 15.16 | 0.16  | >20   |  |       |
| 27 | 5.3   | 0.15  | >20   |  | 0.64  |
| 28 | 8.07  | 0.21  | >20   |  | 0.16  |
| 29 | 14.88 | 0.45  | >20   |  |       |
| 30 | 13.87 | 0.77  | >20   |  |       |
| 31 | 19.42 | 0.21  | >20   |  | 0.37  |
| 32 | 13.5  | 7.14  | >20   |  | 18.74 |
| 33 | 18.68 | 0.9   | >20   |  |       |
| 34 | 14.73 | >20   | >20   |  | >20   |
| 35 | >20   | 0.4   | >20   |  | 0.59  |
| 36 | >20   | 17.39 | >20   |  | >20   |
| 37 | 11.99 | 0.24  | >20   |  | 1.07  |
| 38 | 5.98  | 5.6   |       |  |       |
| 39 | >20   | 0.004 | >20   |  |       |
| 40 | >20   | 4.2   |       |  |       |
| 41 | >20   | 0.54  | >20   |  |       |
| 42 | 13.17 | 10.43 |       |  |       |
| 43 | 13.09 | 0.86  | >20   |  |       |

448 453

|    |       |        |     |  |      |
|----|-------|--------|-----|--|------|
| 44 | 13.76 | >20    |     |  |      |
| 45 | 8.61  | 0.05   | >20 |  |      |
| 46 | 7.41  | 0.0012 |     |  |      |
| 47 | 10.16 | 0.036  | >20 |  |      |
| 48 | >20   | >20    |     |  |      |
| 49 | 17.25 | 0.005  | >20 |  | 1.8  |
| 50 | 3.46  | 0.377  |     |  |      |
| 51 | 7.15  | 0.038  |     |  | 0.86 |
| 52 | 1.62  | 0.0011 |     |  |      |
| 53 | 4.68  | <0.156 |     |  |      |
| 54 | >20   | <0.156 |     |  |      |

A partir de estos datos, es obvio que los compuestos preferidos de la invención son capaces de inhibir las actividades de una variedad de distintas cinasas. También es evidente que los compuestos particulares pueden exhibir una inhibición altamente selectiva. Por ejemplo, el compuesto de sal de clorhidrato 6 (i.e., ácido 5-[4-(1-bencil-1H-indol-5-ilamino)-6-oxo-6,7-dihidropirrol[2,3-d]pirimidin-5-ilidenmetil]-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico clorhidrato (2-morpholin-4-il-etil)-amida) inhibe EGFR en concentraciones muy bajas, incluso exhibe un efecto relativamente bajo sobre la actividad de PDGFR.

5.82 EJEMPLO 62: FORMULACIÓN ORAL

Las formas de dosificación en cápsulas de gelatina que contienen inhibidores de cinasa de la invención pueden prepararse usando los siguientes ingredientes:

| Componente | Cápsula de 5 mg | Cápsula de 10 mg | Cápsula de 20 mg |
|------------|-----------------|------------------|------------------|
|------------|-----------------|------------------|------------------|

|                          |       |      |      |
|--------------------------|-------|------|------|
| Inhibidor de Cinasa      | 5.0   | 10.0 | 20.0 |
| Celulosa microcristalina | 90.0  | 90.0 | 90.0 |
| Almidón pregelatinizado  | 100.3 | 97.8 | 82.8 |
| Croscarmelosa            | 7.0   | 7.0  | 7.0  |
| Estearato de Magnesio    | 0.2   | 0.2  | 0.2  |

El inhibidor de cinasa se tamiza y se mezcla con los excipientes enumerados. La mezcla se usa para llenar cápsulas de gelatina dura de dos piezas de tamaño conveniente usando la maquinaria adecuada y métodos bien conocidos en la técnica. Ver , e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Ediciones 16 o 18, cada una de ellas incorporada a la presente en su totalidad como referencia. Se pueden preparar otras dosis alternado el peso del relleno y si fuera necesario, cambiando el tamaño de la cápsula para que la misma se adecue. Se puede formar cualquiera de las formulaciones estables precedentes para cápsulas de gelatina dura que no sean de lactosa.

Las formas de dosificación de tabletas comprimidos de inhibidores de cinasa se pueden preparar usando los siguientes ingredientes:

| Componente               | Cápsula de 5 mg | Cápsula de 10 mg | Cápsula de 20 mg |
|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| Inhibidor de Cinasa      | 5.0             | 10.0             | 20.0             |
| Celulosa microcristalina | 90.0            | 90.0             | 90.0             |
| Almidón pre-gelatinizado | 100.3           | 97.8             | 82.8             |

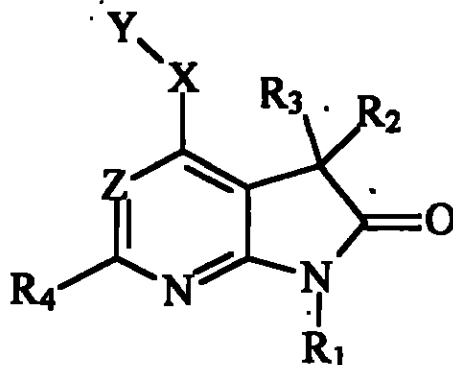
|                       |     |     |     |
|-----------------------|-----|-----|-----|
| Croscarmelosa         | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| Estearato de magnesio | 0.2 | 0.2 | 0.2 |

El inhibidor de cinasa se tamiza a través de un tamiz adecuado y se mezcla con los excipientes no de lactosa hasta que se forma una mezcla uniforme. La mezcla seca se rastrea y se mezcla con el estearato de magnesio. La mezcla de polvo resultante luego se comprime en tabletas de la forma y el tamaño deseados. Se pueden preparar tabletas de otras intensidades alterando la relación del ingrediente activo con el /los excipiente(s) o modificando el peso de la tableta.

Las realizaciones de la invención descritas precedentemente tienen como finalidad ser meramente ejemplos y los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de obtener, con sólo emplear la experimentación de rutina, gran cantidad de equivalentes de los materiales y procedimientos específicos. Todos esos equivalentes se consideran dentro del alcance de la invención y están comprendidos por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto CARACTERIZADO PORQUE tiene la Fórmula 1



o una sal aceptable para uso farmacéutico, solvato, clatrato, o prodroga del mismo, donde:

$R_1$  es H o metilo;

cada uno de  $R_2$  y  $R_3$  es independientemente H, halógeno, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alquilo, o (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alcoxi; o  $R_2$  y  $R_3$  tomados juntos de un metilindeno opcionalmente sustituido o un anillo de 3 a 7 miembros que comprende opcionalmente 0-3 heteroátomos;

$R_4$  es H, metilo, trifluorometilo, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquilo, alcoxi, amido, amino, o arilo opcionalmente sustituido;

X es un enlace químico, etinilo, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O<sub>2</sub>)-, -NR<sub>5</sub>C(O)-, o -NR<sub>5</sub>-, donde  $R_5$  es H, metilo, o metileno sustituido;

Y es un anillo mono o bicclico de 5 a 10 miembros, saturado, insaturado o aromático que comprende 0-3 heteroátomos y opcionalmente sustituido; y

Z es N o CR<sub>6</sub>, donde  $R_6$  es H, halógeno, nitro, clano, alcoxilo, sulfonamida, amino, o amida.

2. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE X es un enlace químico, -O-, -S-, o -NR<sub>5</sub>-.

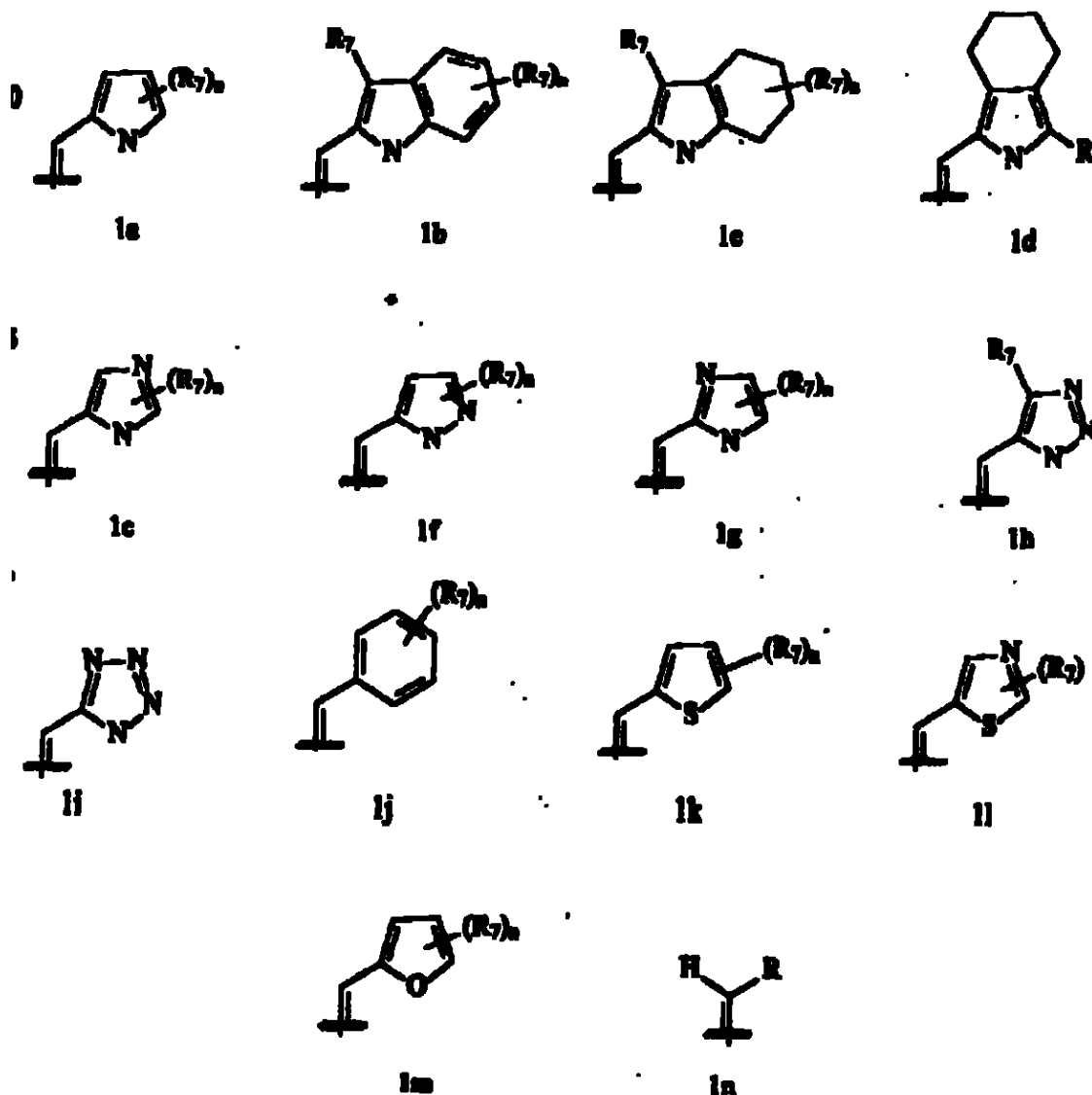
3. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE Y se selecciona entre el grupo que consiste en fenilo, indolilo, indolinilo, 1H-indazolilo, 2,3-dihidro-1H-indazolilo, 1H-bencimidazolilo, 2,3-dihidro-1H-bencimidazolilo, benzotriazolilo, piridilo, pirimidilo, 4-substituted piperazin-1-ilo, morfolino, piperidinilo, pirrolidin-1-ilo, furanilo, tiofenilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, piridopimolilo, piridazopimolilo, pirimidopimolilo, pirazopimolilo, piridofuranilo, y derivados del mismo.

4. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE Z es N o CH.

5. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son ambos H, halógeno, o metilo.

6. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se toman juntos para formar un anillo seleccionado entre el grupo que consiste en 1,3-dioxolano, 1,3-dioxano, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo.

7. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se toman juntos para formar un metilindeno opcionalmente sustituido seleccionado entre aquellos de las fórmulas 1a-1n:



donde:

$n$  es un entero de 0-3;

cada  $R_7$  es independientemente H, alquilo, ácido carboxílico, amina, halógeno, nitro, ciano,  $X_1$ ,  $X_2$ -(C-C<sub>4</sub>)alquil-R<sub>8</sub>,  $X_2$ -(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquenil-R<sub>8</sub>, o  $X_2$ -(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquinil-R<sub>8</sub>;

$X_1$  es  $-C(O)NR_g$ ,  $-NR_gC(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $C(O)R_{11}$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-NR_g$ ,  $-S-$ ,  $-S(O_2)$ , o  $-S(O_2)NR_g$ ;

$X_2$  es un enlace químico,  $-C(O)NR_g$ ,  $-NR_gC(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $C(O)R_{11}$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-NR_g$ ,  $-S-$ ,  $-S(O_2)$ , o  $-S(O_2)NR_g$ ;

$R_g$  se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, dialquilamino, carboxilo, hidroxilo, alcoxi, sulfonamida, urea, carbamato, diol, alquilsulfonilo, y  $R_{10}$ ;

$R_g$  es H o  $(C_1-C_3)$ alquilo;

$R_{10}$  es un heterociclo saturado, insaturado, o aromático de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que comprende de 1 a 4 heteroátomos; y

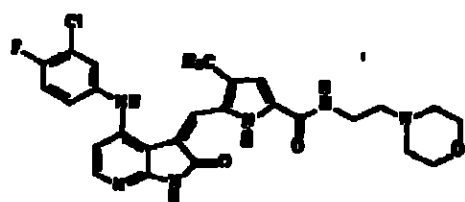
$R_{11}$  es un anillo heterocíclico saturado de 5 a 6 miembros opcionalmente sustituido.

8. El compuesto de la reivindicación 7 CARACTERIZADO PORQUE  $R_7$  es  $X_2-(C_1-C_4)$ alquil- $R_8$ ,  $X_2-(C_1-C_4)$ alquenil- $R_8$ , o  $X_2-(C_1-C_4)$ alquini- $R_8$ , y  $R_8$  se selecciona entre el grupo que consiste en alquilsulfonilo, alcoxi, carboxilo, morfolino, 1-alquil-piperazin-4-ilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piridilo, imidazol, triazol, tetrazol, y tiazol.

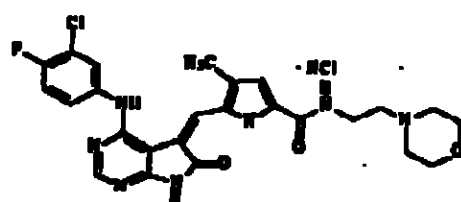
9. El compuesto de la reivindicación 1 donde  $R_4$  es H, metilo, o trifluorometilo.

10. El compuesto de la reivindicación 1 donde si Z es CH,  $R_1$  es  $CH_3$  o  $R_3$  y  $R_2$  no forma un metilindeno opcionalmente sustituido.

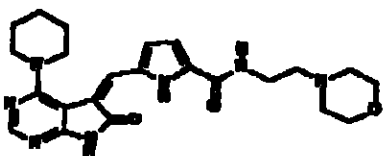
11. Un compuesto CARACTERIZADO PORQUE se selecciona del grupo que consiste en:



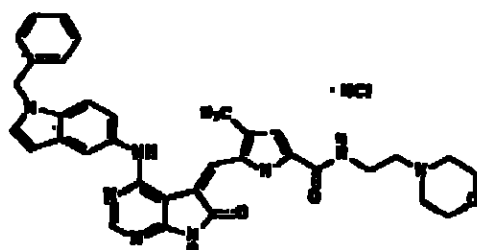
3



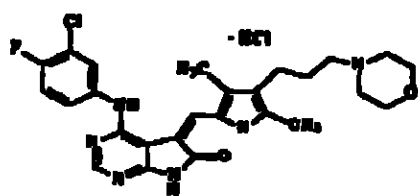
4



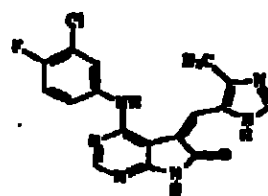
5



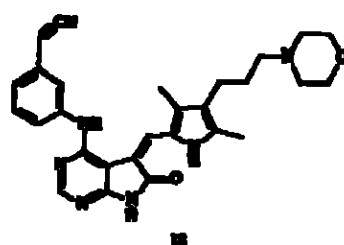
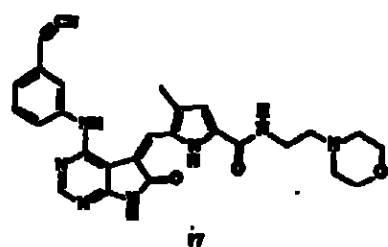
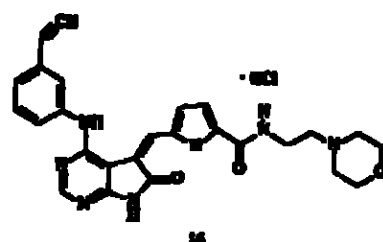
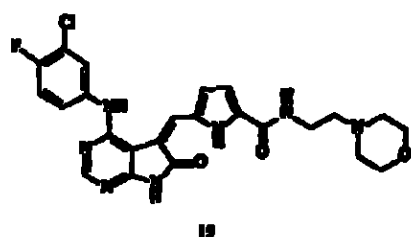
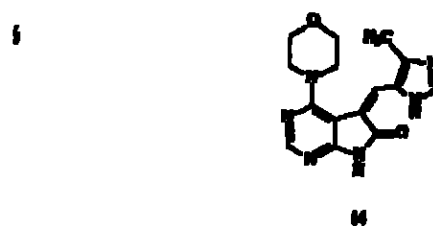
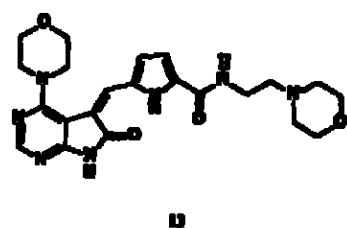
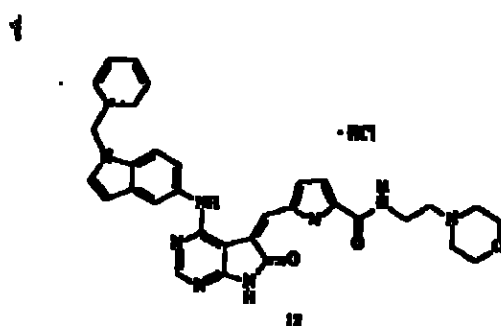
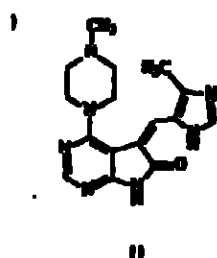
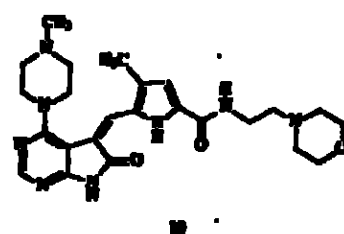
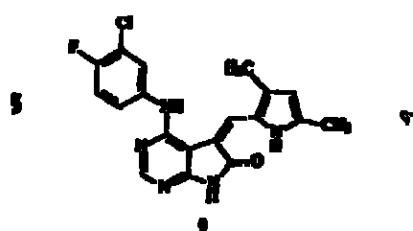
6

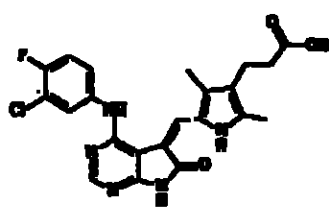


7

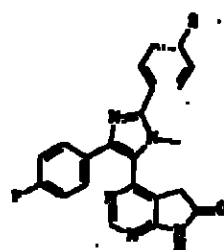


8

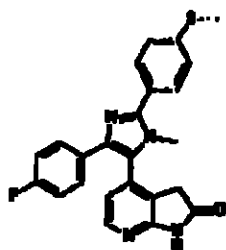




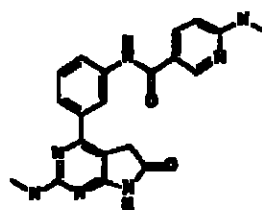
19



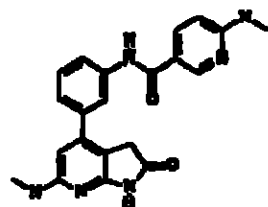
20



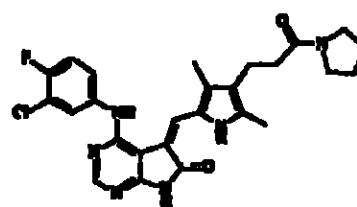
21



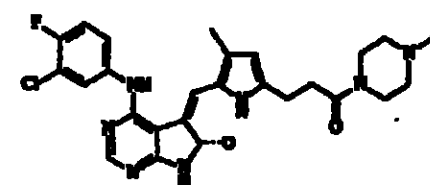
22



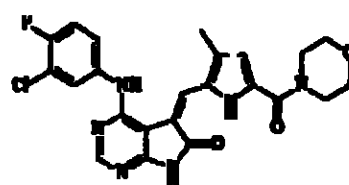
23



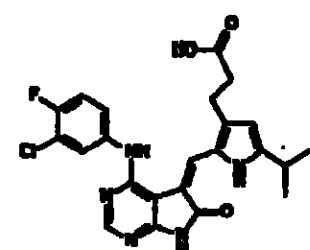
24



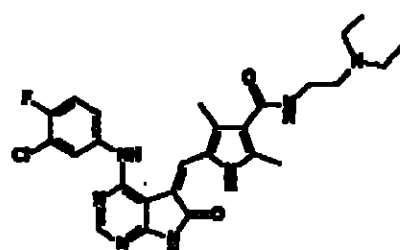
25



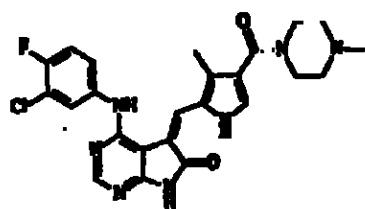
26



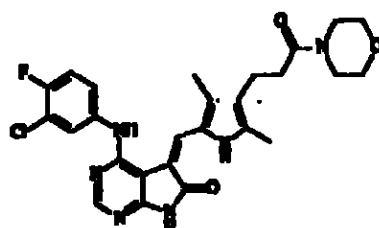
27



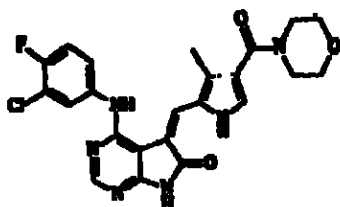
28



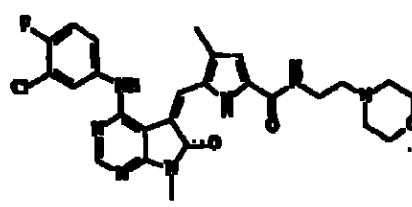
20



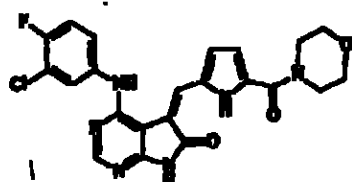
21



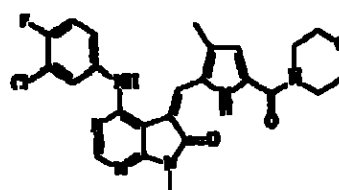
22



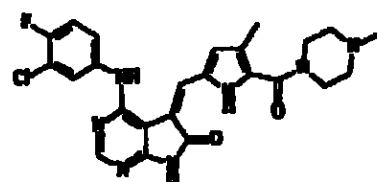
23



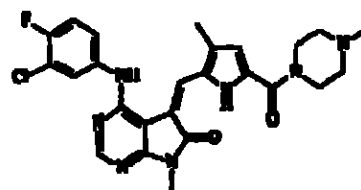
24



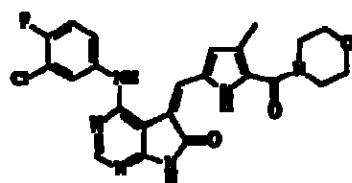
25



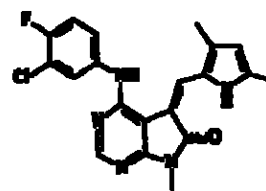
26



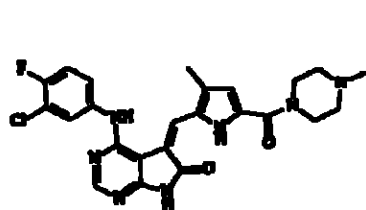
27



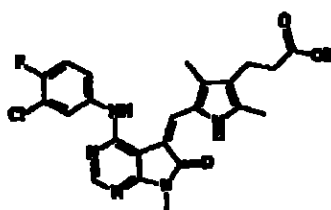
28



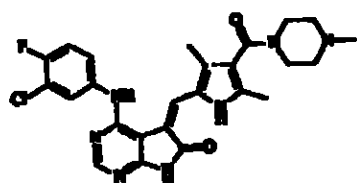
29



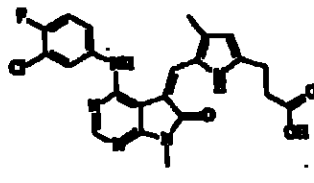
39



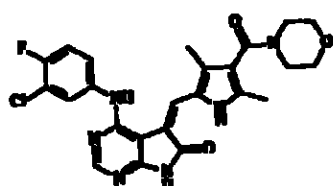
40



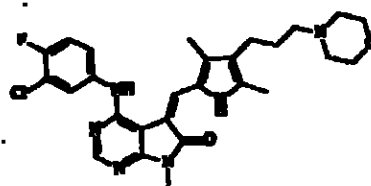
41



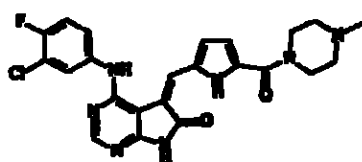
42



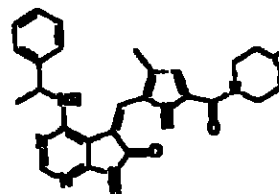
43



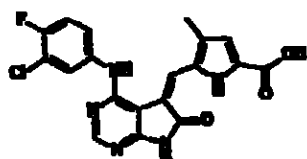
44



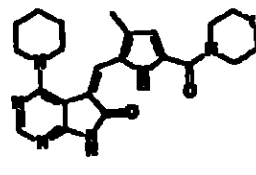
45



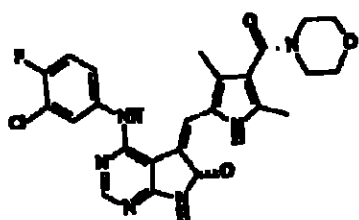
46



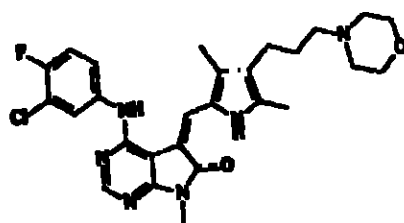
47



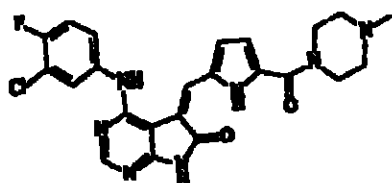
48



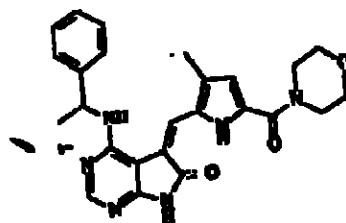
43



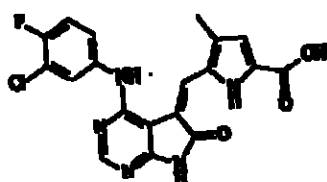
44



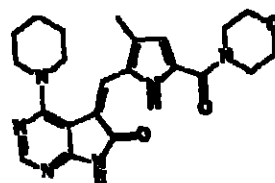
45



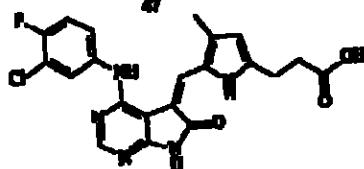
46



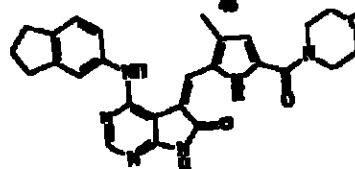
47



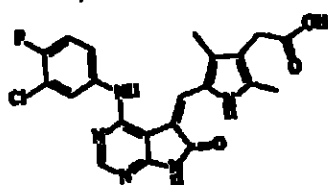
48



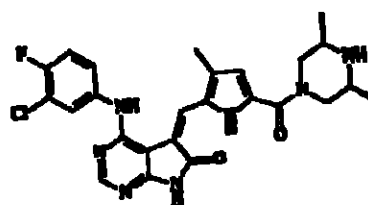
49



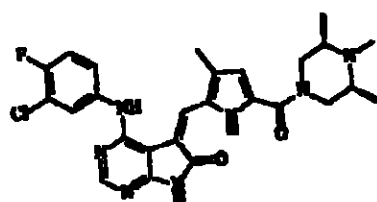
50



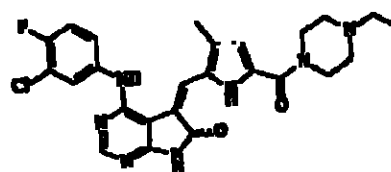
51



52



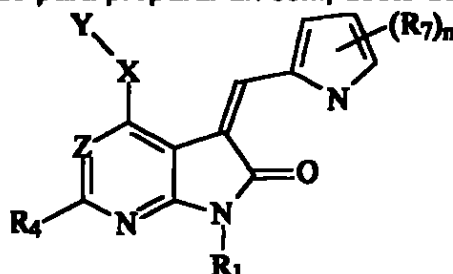
53



54

y sales aceptables para uso farmacéutico, solvatos, clatratos, y prodrogas del mismo.

12. Un método para preparar un compuesto de la Fórmula 2:



o una sal aceptable para uso farmacéutico, solvato, clatrato, o prodroga del mismo, donde:

$R_1$  es H o metilo;

$R_4$  es H, metilo, trifluorometilo,  $(C_1-C_4)$ alquilo, alcoxi, amido, amino, o ario opcionalmente sustituido;

X es un enlace químico, etinilo, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O<sub>2</sub>)-, -NR<sub>5</sub>C(O)-, o -NR<sub>5</sub>-, donde R<sub>5</sub> es H, metilo, o metileno sustituido;

Y es un anillo de 5 a 10 miembros mono o bicíclico, saturado, insaturado, o aromático que comprende 0-3 heteroátomos y opcionalmente sustituido; y

Z es N o CR<sub>6</sub>, donde R<sub>6</sub> es H, halógeno, nitro, ciano, alcoxilo, sulfonamida, amino, o amida;

n es un entero de 0-3;

cada R<sub>7</sub> es independientemente H, alquilo, ácido carboxílico, amina, halógeno, nitro, ciano, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>-(C-C<sub>4</sub>)alquil-R<sub>8</sub>, X<sub>2</sub>-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquenil-R<sub>8</sub>, o X<sub>2</sub>-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquínil-R<sub>8</sub>;

X<sub>1</sub> es -C(O)NR<sub>9</sub>-, -NR<sub>9</sub>C(O)-, -C(O)O-, C(O)R<sub>11</sub>, -OC(O)-, -O-, -NR<sub>9</sub>-, -S-, -S(O<sub>2</sub>), o -S(O<sub>2</sub>)NR<sub>9</sub>;

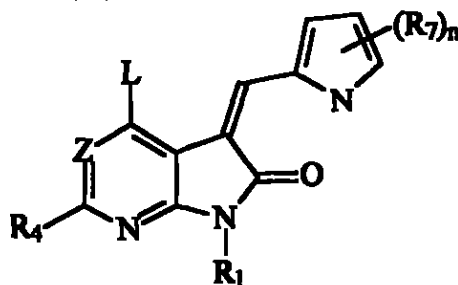
$X_2$  es un enlace químico,  $-C(O)NR_9$ ,  $-NR_9C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $C(O)R_{11}$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-NR_9$ ,  $-S-$ ,  $-S(O_2)$ , o  $-S(O_2)NR_9$ ;

$R_8$  se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, dialquilamino, carboxilo, hidroxilo, alcoxi, sulfonamida, urea, carbamato, diol, alquilsulfonilo, y  $R_{10}$ ;

$R_9$  es H o  $(C_1-C_3)$ alquilo;

$R_{10}$  es un heterociclo saturado, insaturado, o aromático de 5 a 6 miembros opcionalmente sustituido que comprende de 1 a 4 heteroátomos; y

$R_{11}$  es un anillo heterocíclico saturado de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido; CARACTERIZADO PORQUE comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula:



donde L es dejar un grupo con un compuesto de la Fórmula YXH bajo condiciones suficientes para formar un compuesto de la Fórmula 2.

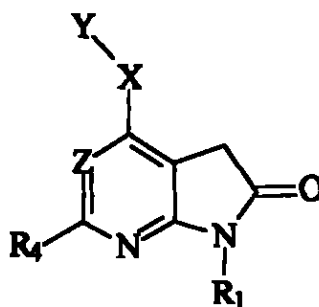
13. El método de la reivindicación 12 CARACTERIZADO PORQUE L se selecciona entre el grupo que consiste en Br, Cl,  $SCH_3$ , y  $S(O)CH_3$ .

14. El método de la reivindicación 12 CARACTERIZADO PORQUE la reacción se lleva a cabo en un solvente polar.

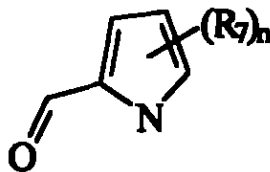
15. El método de la reivindicación 14 CARACTERIZADO PORQUE el solvente polar se selecciona entre el grupo que consiste en alcoholes, DMF, y DMSO.

16. El método de la reivindicación 12 CARACTERIZADO PORQUE la reacción es catalizada por un catalizador seleccionado entre el grupo que consiste en AgOTf, Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, y *p*-TsOH.

17. Un método para preparar un compuesto de la Fórmula 2 CARACTERIZADO PORQUE que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula:



con un compuesto de la fórmula:



bajo condiciones suficientes para formar un compuesto de la Fórmula 2.

18. El método de la reivindicación 17 CARACTERIZADO PORQUE la reacción se lleva a cabo en un solvente polar.

19. El método de la reivindicación 18 CARACTERIZADO PORQUE el solvente polar se selecciona entre el grupo que consiste en alcoholes, DMF, y DMSO.

20. El método de la reivindicación 17 CARACTERIZADO PORQUE se cataliza con una base.

21. El método de la reivindicación 20 CARACTERIZADO PORQUE la base se selecciona entre el grupo que consiste en piridina y piperidina.

22. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende un compuesto de la Fórmula 1, o una sal aceptable para uso farmacéutico, solvato, clatrato, o prodroga del mismo, y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

23. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende un compuesto de la reivindicación 11, y un excipiente o vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

24. La composición farmacéutica de la reivindicación 22 CARACTERIZADA PORQUE es adecuada para administración oral, transdérmica, tópica, parenteral o mucosal.

25. Un método para regular, modular o inhibir la actividad de la proteína quinasa CARACTERIZADO PORQUE comprende poner en contacto un compuesto de la Fórmula 1, o una sal aceptable para uso farmacéutico o solvato del mismo, con una proteína quinasa

26. El método de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE la proteína quinasa es una proteína tirosina quinasa.

27. El método de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE la proteína quinasa se selecciona entre el grupo que consiste en ab1, ATK, bcr-ab1, Blk, Brk, Btk, c-fms, c-kit, c-met, c-src, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, cRaf1, CSF1R, CSK, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, ERK, Fak, fes, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR5, Fgr, FLK-4, flt-1, Fps, Frk, Fyn, GSK, Gst-Flk1, Hck, Her-2, Her-4, IGF-1R, INS-R, Jak, JNK, KDR, Lck, Lyn, MEK, p38, PANHER, PDGFR, PLK, PKC, PYK2, Raf, Rho, ros, SRC, tie1, tie2, TRK, UL97, VEGFR, Yes, y Zap70.

28. El método de la reivindicación 27 CARACTERIZADO PORQUE la proteína quinasa se selecciona entre el grupo que consiste en PANHER, EGFR, Her-2, Her-4, PDGFR, SRC, Lck, cdk2, p38, Raf, y Rho.

29. El método de la reivindicación 28 CARACTERIZADO PORQUE la proteína quinasa se selecciona entre el grupo que consiste en PANHER, CDK2, PDGFR, p38, y Raf.

30. El método de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE la proteína quinasa está en un cultivo celular.

31. El método de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE la proteína quinasa está en un mamífero.

32. Un método de tratar o prevenir una enfermedad de mamíferos caracterizada por una actividad de la proteína quinasa no regulada CARACTERIZADO PORQUE comprende administrar a un mamífero que necesite dicho tratamiento o prevención una cantidad efectiva para uso terapéutico o profiláctico de un compuesto de la Fórmula 1, o una sal aceptable para uso farmacéutico, solvato, clatrato, o prodroga del mismo.

33. El método de la reivindicación 30 CARACTERIZADO PORQUE la enfermedad caracterizada por actividad no regulada de la proteína quinasa se selecciona entre el grupo que consiste en: trastornos proliferativos e los vasos sanguíneos; trastornos fibróticos; trastornos proliferativos de las células mesangiales; trastornos metabólicos; alergias; asma; trombosis; enfermedades del sistema nervioso; y cáncer.

34. El método de la reivindicación 31 CARACTERIZADO PORQUE la enfermedad caracterizada por actividad no regulada de la proteína quinasa es cáncer.

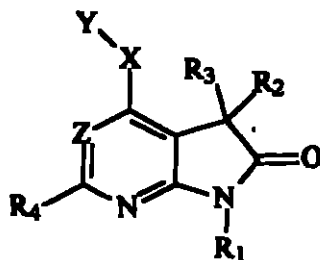
35. El método de la reivindicación 32 CARACTERIZADO PORQUE el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mamas, de estómago, de ovarios, de colon, de pulmón, de cerebro, de laringe, del sistema linfático, del tracto genitourinario (incluyendo vejiga y próstata), de ovarios gástrico, óseo, y pancreático. -

467 472  
~~187~~

**7-AZA-INDOLIN-2-ONAS SUSTITUÍDAS EN 4 Y SU USO COMO**  
**INHIBIDORES DE PROTEÍNA QUINASA**

**RESUMEN**

7-aza-indolin-2-onas sustituidas en 4 y su uso como inhibidores de la proteína quinasa. Las 7-aza-indolin-2-onas sustituidas en 4 específicas de la presente tienen la Fórmula 1



y sus sales aceptables para uso farmacéutico, solvatos, clatratos, y prodrogas del mismo, donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, X, Y, y Z se definen en la memoria descriptiva. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden los compuestos de Fórmula 1 y con métodos para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades tales como, por ejemplo, el cáncer.

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

468

Folio 473<sup>a</sup>

Radicación no 00-97184

Concepto Técnico no 1245

Clasificación Internacional de Patentes A61K 31/407

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- SI ☒ NO ☐ Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).
- SI ☒ NO ☐ NO ES APLICABLE ☐ Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).
- SI ☐ NO ☒ NO ES APLICABLE ☒ Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i).
- SI ☐ NO ☒ La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J).
- SI ☒ NO ☐ La prioridad coincide con la materia reivindicada.
- SI ☒ NO ☐ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

- Se anexa nueva solicitud que contiene capítulo reivindicatorio y descriptivo corregido, tal como se había solicitado en el primer examen de forma. Folios 327-472.

EXAMINADOR TÉCNICO  
202046

Bogotá D. C., Septiembre 16 de 2002



2020  
Bogotá DC

Doctor(a)  
DILIA MARIA RODRIGUEZ D' ALEMAN  
Apoderado(a)

|                    |                |          |
|--------------------|----------------|----------|
| <b>REFERENCIA:</b> | Radicación No. | 00-87184 |
|                    | Trámite        | 002      |
|                    | Evento         | 001      |
|                    | Actuación      | 418      |
|                    | Oficio No.     | 2178     |
|                    | Folios         | 001      |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase

Dado en Bogotá DC, a los

26 de Julio de 2020

  
**ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL**  
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202046

527