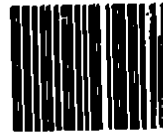


PETITORIO

01/12068

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3



01 12068

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención
Utilidad

☐ Patente de Modelo de

2) SOLICITANTE
(71)

Nombre: SUGEN, INC.

Dirección: 230 East Grand Avenue
South San Francisco, CA 94080-
4811 Estados Unidos de América

Domicilio: California, Estados Unidos

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO _____

3) REPRESENTATE
APODERADO
(74)

Nombre: DILIA MARÍA
RODRÍGUEZ D'ALEMAN
Dirección: Carrera 11 N°. 93-43 Of.
404 Santafé de Bogotá D.C.

Teléfono: 6350835 Fax: 6350824
E. Mail:
clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO: 41.654.882
TP: 20824 CSJ

4) INVENTOR (ES)

Nombre:
Dirección:
Teléfono Fax:
E. Mail:
Domicilio:

VER HOJA ANEXA (Fol. 2)

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO _____

5) Título (54) INDOLINONAS SUSTTITUIDAS CON PIRROLES INHIBIDORAS DE
PROTEINQUINASAS

6) Clasificación Internacional (51) A 61 K 31 / 404

7) PRIORIDAD

SI ☒ NO ☐

33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de
Solicitud

Estados Unidos

Febrero 15, 2000

60/182.710

Estados Unidos

Julio 6, 2000

60/216.422

Estados Unidos

Octubre
27, 2000

60/243.532

8) Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐

9) Comprobante de pago N° 6630,813,813, Fecha 6.02/01 y 9.02/01
8136

1. TANG, Peng Cho ✓
827 Camino Ricardo, Moraga CA 94556 ✕
Estados Unidos de América
2. MILLER, Todd ✓
1713 N.E. Hollow Tree Lane, Bend, OR 97701 ✕
Estados Unidos de América
3. LI, Xiaoyuan ✓
2020 Victoria Court, Los Altos, CA 94024 ✕
Estados Unidos de América
4. SUN, Li ✓
1151 Rickover Lane, Foster City, CA 94404 ✕
Estados Unidos de América
5. WEI, Chung Chen ✓
39 Commons Lane, Foster City, CA 94404 ✕
Estados Unidos de América
6. SHIRAZIAN, Shahrzad ✓
1 Constitution Drive, Corte Madera, CA 94925 ✕
Estados Unidos de América
7. LIANG, Congxin ✓
729 W. Remington Drive, Sunnyvale, CA 94087 ✕
Estados Unidos de América
8. VOJKOVSKY, Tomas ✓
333 Catalpa Nr. 6, San Mateo, CA 94080 ✕
Estados Unidos de América
9. ASAAD S. Nematalla ✓
4492 Sweet Shrub Court, Concord, CA 94521 ✕
Estados Unidos de América

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 6,678
FECHA : FEBRERO 6 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE NOBET Y CO. COLOMBRECIBO DE CAJA				3030	23/01/2001	608,000.00
CLARKE NOBET Y CO. COLOMBRECIBO DE CAJA				4446	30/01/2001	608,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356,640.00
		TOTAL :	356,640.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador: 382 0840
 Fax: 350 5220
 e-mail: info@sic.gov.co
 www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

RC 4
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

Industria y Comercio
Superintendencia de Industria y Comercio
Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Bogotá, D.C., Colombia

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 8,175
FECHA : FEBRERO 9 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MORET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3033495	09/02/2001	2,223,040.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
		TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 8,177
 FECHA : FEBRERO 9 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE NOBET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3033495	09/02/2001	2,223,040.00

***** CONCEPTO *****

CANT. REENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador: 382 0840
 Fax: 350 5220
 e-mail: info@sic.gov.co
 www.sic.gov.co
 Bogotá, D C , Colombia

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 8,176
FECHA : FEBRERO 9 DE 2001

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	3033495	09/02/2001	2,223,040.00

CONCEPTO

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
		TOTAL :	\$ 100,000.00

SOM: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

10)
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y /o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12)

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

2- INDOLINONAS SUSTITUIDAS CON PIRROLES INHIBIDORAS DE PROTEINQUINASAS

REFERENCIAS

Esta solicitud reivindica prioridad bajo 35 U.S.C. 119(e) de las Solicitudes Provisionales de los EEUU Número 60/182710, presentada el 15 de Febrero de 2000, Número 60/216422, presentada el 6 de Julio de 2000 y 60/243532, presentada el 27 de Octubre de 2000, cuyas memorias descriptivas se incorporan por completo a modo de referencia a la presente documentación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con algunos compuestos de 2- indolinona sustituidos con 3- pirroles que modulan la actividad de proteinquinasas ("PK"). Los compuestos de esta invención son entonces útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con una actividad anormal de las PK. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y métodos para prepararlas.

Estado de la Técnica

Se menciona lo siguiente solamente a modo de información acerca de los antecedentes y no se lo admite como técnica previa a la presente invención.

Las PK son enzimas que catalizan la fosforilación de los grupos hidroxilo en los residuos de tirosina, serina y treonina en las proteínas. Las consecuencias de esta actividad aparentemente simple son sorprendentes; crecimiento, diferenciación y proliferación celular, es decir, virtualmente todos los aspectos de la vida de la célula dependen de uno u otro modo de la actividad de las PK. Además, se ha relacionado la actividad anormal de la PK con un conjunto de afecciones que van desde enfermedades que no afectan mayormente la vida, tales como la psoriasis, hasta enfermedades extremadamente virulentas, tales como el glioblastoma (cáncer de cerebro).

Las PK pueden dividirse convenientemente en dos clases, las proteintirosinquinasas (PTK) y las serin - treoninquinasas (STK).

Uno de los aspectos más importantes de la actividad de las PTK es su

interacción con receptores de factores de crecimiento. Los receptores de factores de crecimiento son proteínas en la superficie de las células. Cuando se unen a un ligando tipo factor de crecimiento, los receptores de factores de crecimiento se convierten en una forma activa que interactúa con las proteínas en la superficie interna de la membrana celular. Esto conduce a la fosforilación de los residuos de tirosina de los receptores y de otras proteínas, y a la formación dentro de la célula de complejos con una variedad de moléculas de señalización citoplasmática que, a su vez, desencadenan numerosas respuestas de la célula, tales como la división celular (proliferación), la diferenciación celular, el crecimiento celular, la expresión de efectos metabólicos en el microambiente extracelular, etcétera. Para una descripción más completa, véase Schlessinger y Ullrich, Neuron, 9: 303-391 (1992) que se incorpora a modo de referencia, incluyendo cualquier dibujo, como se indica por completo en la presente documentación.

Los receptores de factores de crecimiento con actividad de PTK se conocen como receptores de tirosinquinasa ("RTK"). Comprenden una gran familia de receptores transmembrana con una actividad biológica diversa. En la actualidad, se han identificado al menos diecinueve (19) subfamilias diferentes de RTK. Un ejemplo de éstas es la subfamilia denominada RTK "HER", que incluye EGFR (receptores de factores de crecimiento epiteliales), HER2, HER3 y HER4. Estas RTK consisten en un dominio extracelular glicosilado de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular citoplasmático catalítico que puede fosforilar los residuos de tirosina en las proteínas.

Otra subfamilia de RTK consiste en receptores de insulina (IR), el receptor del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-1R) y el receptor relacionado con insulina (IRR). IR e IGF-1R interactúan con la insulina, el IGF-I y el IGF-II para formar un heterotetrámero de dos subunidades α glicosiladas completamente extracelulares y dos subunidades β que cruzan la membrana celular y que contienen el dominio de la tirosinquinasa.

Una tercera subfamilia de RTK se conoce como el grupo de los receptores de factores de crecimiento derivados de plaquetas ("PDGFR"), que incluye PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, c-kit y c-fms. Estos receptores consisten en dominios glicosilados

extracelulares compuestos de cantidades variables de rizados semejantes a inmunoglobinas y un dominio intracelular, donde el dominio de la tirosinquinasa está interrumpido por secuencias no relacionadas de aminoácidos.

Otro grupo que, debido a su semejanza con la subfamilia PDGFR, se une a veces al grupo anterior es el de la subfamilia de receptores de quinasas hepáticas fetales ("flk"). Se cree que este grupo está compuesto por un dominio receptor insertado para quinasa hepática fetal 1 (KDR/FLK-1, VEGF-R2), flk-1R, flk-4 y tirosinquinasa tipo fms 1 (flt-1).

Otro miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento de tirosinquinasa es el subgrupo de los receptores del factor de crecimiento de los fibroblastos ("FGF"). Este grupo consiste en cuatro receptores, FGFR1-4, y siete ligandos, FGF1-7. Si bien aún no se halla bien definido, este grupo parece abarcar receptores que consisten en un dominio extracelular glicosilado que contiene una cantidad variable de rizados semejantes a inmunoglobinas y un dominio intracelular, donde el dominio de la tirosinquinasa está interrumpido por secuencias no relacionadas de aminoácidos.

Aún otro miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento de tirosinquinasa es el subgrupo de receptores de factores de crecimiento vasculares endoteliales (VEGF). La VEGF es una glicoproteína dimérica similar a la PDGF pero tiene funciones biológicas diferentes y una especificidad distinta por células blanco in vivo. En particular, se cree actualmente que la VEGF tiene una función esencial en la vasculogénesis y la angiogénesis.

Se describe un listado más completo de las subfamilias conocidas de RTK en Plowman et al., DN&P, 7(6): 334-339 (1994), que se incorpora a modo de referencia, incluyendo cualquier dibujo, como se indica por completo en la presente documentación.

Además de las RTK, también existe una familia de PTK completamente intracelulares denominadas "tirosinquinasa que no son receptores" o "tirosinquinasa celulares". Esta última denominación, abreviada "CTK," es la que se usará en la presente documentación. Las CTK no contienen dominios extracelulares o dominios transmembrana. Hasta la actualidad se han descrito más de 24 CTK en 11 subfamilias

(Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes, Fps, Fak, Jak y Ack). La subfamilia Src parece ser hasta ahora el mayor grupo de CTK e incluye Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr y Yrk. Para una descripción más detallada de CTK, véase Bolen, Oncogene, 8: 2025-2031 (1993), que se incorpora a modo de referencia, incluyendo cualquier dibujo, como se indica por completo en la presente documentación.

Las serin/treonin quinasas, STK, como las CTK, son predominantemente intracelulares, aunque existen unos pocos receptores de quinasas tipo STK. Las STK son las quinasas citosólicas más comunes, es decir, quinasas que llevan a cabo su función en una parte del citoplasma distinta de las organelas y del citoesqueleto. El citosol es la región dentro de la célula en la cual ocurre gran parte de la actividad metabólica y biosintética intermedia, por ejemplo, es en el citosol que se sintetizan las proteínas en los ribosomas.

Las RTK, las CTK y las STK han sido todas relacionadas con una cantidad de condiciones patogénicas que incluyen significativamente al cáncer. Otras condiciones patogénicas que se han asociado con las PTK incluyen, sin limitaciones, la psoriasis, la cirrosis hepática, la diabetes, la angiogénesis, la restenosis, las enfermedades oculares, la artritis reumatoide y otras afecciones inflamatorias, trastornos inmunológicos tales como las enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares tales como la arteriosclerosis y una variedad de trastornos renales.

Respecto del cáncer, dos de las hipótesis más importantes para explicar la proliferación celular excesiva que conduce al desarrollo de tumores se relaciona con funciones conocidas como reguladas por la PK. Es decir, se ha sugerido que el crecimiento de células malignas resulta de una ruptura en los mecanismos que controlan la división y/o la diferenciación celular. Se ha demostrado que los productos proteicos de una cantidad de proto-oncogenes están involucrados en las vías de transducción de señales que regulan el crecimiento y la diferenciación celular. Estos productos proteicos de proto-oncogenes incluyen los factores de crecimiento extracelulares, los receptores de factores de crecimiento transmembrana PTK (RTK), las PTK citoplasmáticas (CTK) y las STK citosólicas que se describieron previamente.

A la vista de la conexión aparente entre las actividades celulares relacionadas con la PK y una amplia variedad de trastornos humanos, no es sorprendente que se

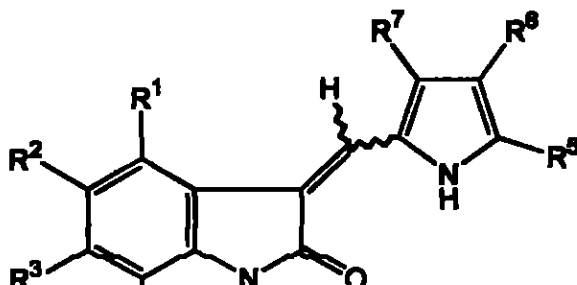
haga un gran esfuerzo en un intento de identificar maneras de modular la actividad de las PK. Algunos de esos esfuerzos han involucrado enfoques biomiméticos que usan grandes moléculas basadas en aquellas involucradas en los procesos celulares reales (por ejemplo, ligandos mutantes (Solicitud de los EEUU N° 4966849); receptores y anticuerpos solubles (Solicitudes N° WO 94/10202, Kendall y Thomas, Proc. Nat'l Acad. Sci., 90: 10705-09 (1994), Kim, et al., Nature, 362: 841-844 (1993)); ligandos de ARN (Jelinek, et al., Biochemistry, 33: 10450-56); Takano, et al., Mol. Bio. Cell 4: 358A (1993); Kinsella, et al., Exp. Cell Res. 199: 56-62 (1992); Wright, et al., J. Cellular Phys., 152: 448-57) e inhibidores de la tirosinquinasa (WO 94/03427; WO 92/21660; WO 91/15495; WO 94/14808; Patente de los EEUU N° 5330992; Mariani, et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 35: 2268 (1994)).

Además de los anteriores, se han hecho esfuerzos para identificar pequeñas moléculas que actúen como inhibidores de la PK. Por ejemplo, se han descrito compuestos bis-monocíclicos, bicíclicos y heterocíclicos de arilo (PCT WO 92/20642), derivados de vinilenazaindol (PCT WO 94/14808) y 1- ciclopropyl -4- piridilquinolonas (Patente de los EEUU N° 5330992) como inhibidores de la tirosinquinasa. Se han descrito compuestos de estirilo (Patente de los EEUU N° 5217999), compuestos de piridilo sustituidos con estirilo (Patente de los EEUU N° 5302606), derivados de quinazolina (Solicitud EP N° 0 566 266 A1), selenaindoles y selénidos (PCT WO 94/03427), compuestos tricíclicos polihidroxílicos (PCT WO 92/21660) y compuestos de ácido bencilfosfónico (PCT WO 91/15495) todos como inhibidores de la PTK útiles en el tratamiento del cáncer.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención tiene como objeto determinados compuestos de 2-indolinona sustituidos con 3-pirroles que presentan capacidad de modulación de la PK y que por lo tanto son útiles para el tratamiento de afecciones relacionadas con la actividad anormal de la PK.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención tiene como objeto 2-indolinonas sustituidas con 3-pirrol de la Fórmula (I):



(I)

donde:

R^1 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclico, hidroxilo, alcoxi, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_nR^{16}$ y $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alquilo, trihalometilo, hidroxilo, alcoxi, ciano $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ y $-SO_2R^{20}$ (donde R^{20} es alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo y heteroaralquilo);

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, alquilo, trihalometilo, hidroxilo, alcoxi, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, arilo, heteroarilo, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-NR^{13}C(O)OR^{14}$ y $-SO_2R^{20}$ (donde R^{20} es alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo y heteroaralquilo);

R^4 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, alquilo, hidroxilo, alcoxi y $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y $-C(O)R^{10}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y $-C(O)R^{10}$;

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, $-C(O)R^{17}$ y $-C(O)R^{10}$; o

R^6 y R^7 se pueden combinar para formar un grupo seleccionado entre el grupo formado por $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ y $-(CH_2)_6-$;

con la condición de que al menos uno entre R^5 , R^6 o R^7 debe ser $-C(O)R^{10}$;

R^8 y R^9 se seleccionan independientemente entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo y arilo;

R^{10} se selecciona del grupo formado por hidroxilo, alcoxi, ariloxi, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$, y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo;

R^{12} se selecciona del grupo formado por $-NR^{13}R^{14}$, hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, arilo,

heteroarilo, $-N^+(O^-)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$, y

$-NHC(O)R^a$ (donde R^a es alquilo, haloalquilo, o aralkilo insustituido);

R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo, cianoalquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo; o

R^{13} y R^{14} se pueden combinar para formar un grupo heterociclo;

R^{15} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, hidroxilo, alcoxi y arilo;

R^{16} se selecciona del grupo formado por hidroxilo,

$-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ y $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} se selecciona del grupo formado por alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo;

R^{20} es alquilo, arilo, aralkilo o heteroarilo; y

n y r son independientemente 1, 2, 3, o 4;

o una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico.

Preferentemente, R^1 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclico, hidroxilo, alcoxi, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_nR^{16}$ y $-C(O)NR^aR^b$;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alquilo, trihalometilo, hidroxilo, alcoxi, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, alquilo, trihalometilo, hidroxilo, alcoxi, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, arilo, heteroarilo, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, and $-NR^{13}C(O)OR^{14}$;

R^4 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, alquilo, hidroxilo, alcoxi y $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y $-C(O)R^{10}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y $-C(O)R^{10}$;

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, $-C(O)R^{17}$ y $-C(O)R^{10}$;

R^8 y R^7 se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo formado por $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_5$ y $-(CH_2)_6$;

con la condición de que al menos uno de R^5 , R^6 o R^7 debe ser

$-C(O)R^{10}$;

R^8 y R^9 se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno,

alquilo y arilo;

R^{10} se selecciona del grupo formado por hidroxilo, alcoxi, ariloxi, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo;

R^{12} se selecciona del grupo formado por $-NR^{13}R^{14}$, hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, arilo y heteroarilo;

R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo;

R^{13} y R^{14} se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo formado por $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_5$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2$, y $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$;

R^{15} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, hidroxilo, alcoxi y ariloxi;

R^{16} se selecciona del grupo formado por hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ y $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} se selecciona del grupo formado por alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo; y

n y r son independientemente 1, 2, 3, o 4;

o una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico.

En un segundo aspecto, esta invención tiene como objeto una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos(s) de la Fórmula (I) o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo y un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

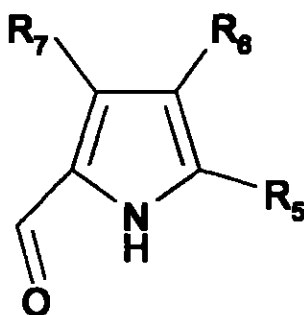
En un tercer aspecto, esta invención tiene como objeto un método para tratar enfermedades en las que interviene la actividad anormal de la proteinquinasa, en particular, tirosinquinasa receptoras (RTK), protein tirosinquinasa no receptoras (CTK) y serin/treonin proteinquinasa (STK) en un organismo, en particular en seres humanos, método que comprende administrar a dicho organismo una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I). Tales enfermedades incluyen por ejemplo, no taxativamente, cáncer, diabetes, cirrosis hepática, enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, angiogénesis, enfermedades inmunológicas tales como enfermedades autoinmunes y enfermedades renales.

En un cuarto aspecto, esta invención tiene como objeto un método para modular

la actividad catalítica de las PK, en particular, tirosinquinasa receptoras (RTK), protein tirosinquinasa no receptoras (CTK) y serin/ treoninproteinquinasa (STK), usando un compuesto de esta invención, que puede realizarse in vitro o in vivo. En particular, la proteinquinasa receptora cuya actividad catalítica es modulada por un compuesto de la presente invención se selecciona del grupo formado por EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, C-Kit, C-fms, Flk-1R, Flk4, KDR/Flk-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R, FGFR-3R y FGFR-4R. La tirosinquinasa celular cuya actividad catalítica es modulada por un compuesto de la presente invención se selecciona del grupo formado por Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr y Yrk. La serin-treoninproteinquinasa cuya actividad catalítica es modulada por un compuesto de esta invención se selecciona del grupo formado por CDK2 y Raf.

En un quinto aspecto, esta invención tiene como objeto el uso de un compuesto de la Fórmula (I) en la preparación de un medicamento que es útil en la preparación de un medicamento que es útil en el tratamiento de una enfermedad en la que interviene la actividad anormal de la PK.

En un sexto aspecto, esta invención tiene como objeto un intermediario de la Fórmula (II):



(II)

donde:

R⁵ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y -C(O)R¹⁰;

R⁶ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y -C(O)R¹⁰;

R⁷ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, -C(O)R¹⁷ y -C(O)R¹⁰;

R⁶ y R⁷ se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo formado por -(CH₂)₄-, -(CH₂)₅- y -(CH₂)₆-;

con la condición de que al menos uno de R^5 , R^6 o R^7 debe ser

$-C(O)R^{10}$;

R^{10} se selecciona del grupo formado por hidróxi, alcoxi, ariloxi, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo;

R^{12} se selecciona del grupo formado por $-NR^{13}R^{14}$, hidróxi, $-C(O)R^{15}$, arilo y heteroarilo;

R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo, cianoalquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo; o

R^{13} y R^{14} se pueden combinar para formar un grupo heterociclo;

R^{15} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, hidróxi, alcoxi y ariloxi;

R^{17} se selecciona del grupo formado por alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo; y n es 1, 2, 3, o 4.

Preferentemente, R^5 o R^6 , en el compuesto de fórmula II, es $-C(O)R^{10}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, y alquilo, más preferentemente hidrógeno o metilo;

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, y alquilo, más preferentemente hidrógeno o metilo cuando R^6 es $-COR^{10}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, y alquilo, más preferentemente hidrógeno o metilo cuando R^5 es $-COR^{10}$;

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, y arilo, más preferentemente hidrógeno, metilo o fenilo;

R^{10} se selecciona del grupo formado por hidróxi, alcoxi, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo, más preferentemente hidrógeno o metilo;

R^{12} se selecciona del grupo formado por $-NR^{13}R^{14}$;

R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, o alquilo; o

R^{13} y R^{14} se pueden combinar para formar un grupo heterociclo; y

n es 1, 2 ó 3.

101

Dentro de los grupo preferidos mencionados, los grupos de compuestos intermediarios más preferidos son aquéllos donde R^5 , R^6 , R^{11} , R^{12} , R^{13} o R^{14} son independientemente grupos descritos en la sección titulada "realizaciones preferidas" que figura a continuación.

En un séptimo aspecto, esta invención tiene como objeto métodos para preparar compuestos de fórmula (I).

Finalmente, esta invención también tiene como objeto identificar un compuesto químico que modula la actividad catalítica de una proteinquinasa poniendo en contacto células que expresan dicha proteinquinasa con un compuesto o una sal de la presente invención y analizar dichas células para verificar su efecto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Salvo que se indique expresamente lo contrario, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones, tienen los siguientes significados:

"Alquilo" se refiere a un radical hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y ramificada de 1 a 20 átomos de carbono (cuando se establece un rango numérico, por ejemplo "1-20", significa que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc. hasta e inclusive 20 átomos de carbono). Los grupos alquilo que contienen entre 1 y 4 átomos de carbono se denominan grupos alquilo inferior. Cuando dichos grupos alquilo inferior carecen de sustituyentes, se las denomina grupos alquilo inferior insustituídos. Más preferentemente, un grupo alquilo es un alquilo de tamaño mediano con entre 1 y 10 átomos de carbono por ejemplo, metilo, etilo, propilo, 2-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *tert*-butilo, pentilo, y similares. Más preferentemente, es un alquilo inferior que tiene entre 1 y 4 átomos de carbono por ejemplo, metilo, etilo, propilo, 2-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, o *tert*-butilo, y similares. El grupo alquilo puede ser sustituido o insustituido. cuando sustituido, el o los grupos sustituyente/s son preferentemente uno o más, más preferentemente entre uno y tres, aún más preferentemente uno o dos sustituyente(s) seleccionados independientemente del grupo formado por halo, hidroxilo, alcoxi inferior insustituido, arilo opcionalmente

sustituido con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, arioxi opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, de 6 miembros heteroarilo que tienen entre 1 y 3 átomos de nitrógeno en el anillo, siendo los carbonos en el anillo opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, heteroarilo de 5 miembros que tienen entre 1 a 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno en el grupo son opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí halo, hidroxilo, grupos alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, grupos heterocíclico de 5 ó 6 miembros que tienen entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno (si se encuentran presentes) en el grupo son opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí halo, hidroxilo, grupos alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, mercapto, (alquilo inferior)tio insustituido, ariotio opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, ciano, acilo, tioacilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, y $-NR^{18}R^{19}$, donde R^{18} y R^{19} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, grupos alquilo inferior insustituido, trihalometilo, (C_3-C_6) cicloalquilo insustituido, alquilo inferior insustituido, alquinilo inferior insustituido y arilo opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido.

Preferentemente, el grupo alquilo es sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo formado por hidroxilo, grupos

heteroalilcíclicos de 5 ó 6 miembros que tienen entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno (si se encuentran presentes) en el grupo son opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí grupos halo, hidroxí, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, de 5 miembros heteroarilo que tienen entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno en el grupo son opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí grupos halo, hidroxí, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, heteroarilo de 6 miembros que tiene entre 1 y 3 átomos de nitrógeno en el anillo, los carbonos en el anillo son opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferentemente uno, dos o tres grupos que son independientemente entre sí grupos halo, hidroxí, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, o $-NR^{18}R^{19}$, donde R^{18} y R^{19} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior insustituido. Aún más preferentemente el grupo alquilo es sustituido con uno o dos sustituyentes que son independientemente entre sí hidroxí, dimetilamino, etilamino, dietilamino, dipropilamino, pirrolidino, piperidino, morpholino, piperazino, 4- alquilpiperazino inferior, fenilo, imidazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, oxazolilo, triazinilo, y similares.

"Cicloalquilo" se refiere a un anillo monocíclico de 3 a 8 miembros con todos carbonos, un anillo fusionado de 5 miembros/6 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 6 miembros/6 miembros de todos carbonos o un anillo multicíclico fusionado (un sistema anillo "fusionado" significa que cada anillo en el sistema comparte un par de átomos de carbono adyacentes con cada otro anillo en el sistema) donde uno o más de los anillos puede contener uno o más doble ligaduras pero ninguno de los anillos tiene un sistema de electrones pi conjugado.

Algunos ejemplos no limitativos de grupos cicloalquilo son ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexadieno, adamantano, cicloheptano, cicloheptatrieno, y similares. Un grupo cicloalquilo puede ser sustituido o insustituido. Cuando es sustituido, el o los grupo/s sustituyente(s) es preferentemente uno o más, más preferentemente uno o dos sustituyentes, seleccionados

independientemente del grupo formado por alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, halo, hidroxi, alcoxi inferior insustituido, arilo opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente uno o dos grupos independientemente entre sí grupos halo, hidroxi, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, ariloxi opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente uno o dos grupos, independientemente entre sí grupos halo, hidroxi, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, heteroarilo de 6 miembros que tiene entre 1 y 3 átomos de nitrógeno en el anillo, los carbonos en el anillo son opcionalmente sustituidos con uno o más, preferentemente uno o dos grupos independientemente entre sí grupos halo, hidroxi, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, heteroarilo de 5 miembros que tiene entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre, donde los átomos de carbono e hidrógeno del grupo son opcionalmente sustituidos con uno o más, preferentemente uno o dos grupos independientemente entre sí grupos halo, hidroxi, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, grupos heteroalilcíclico de 5 ó 6 miembros que tienen entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno (si están presentes) en el grupo son opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente uno o dos grupos independientemente entre sí grupos halo, hidroxi, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, mercapto, (alquilo inferior insustituido)tio, ariltio opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente uno o dos grupos independientemente entre sí grupos halo, hidroxi, alquilo inferior insustituido o alcoxi inferior insustituido, ciano, acilo, tioacilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)$ -, $R^{18}S(O)_2$ -, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O$ -, y $-NR^{18}R^{19}$.

"Alquenilo" se refiere a un grupo alquilo inferior, según se ha definido, que comprende al menos dos átomos de carbono y al menos una doble ligadura carbono-carbono. Entre los ejemplos representativos se incluye, sin limitación, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-, 2-, o 3-butenilo, y similares.

"Alquinilo" se refiere a un grupo alquilo inferior, según se ha definido, que comprende al menos dos átomos de carbono y al menos una triple ligadura carbono-carbono. Entre los ejemplos representativos se incluyen, sin limitación, etinilo, 1-

propinilo, 2-propinilo, 1-, 2-, o 3-butinilo, y similares.

"Ariilo" se refiere a un sistema fusionado monocíclico de todos carbonos o policíclico de todos carbonos (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) grupos de 1 y 12 átomos de carbono con un sistema de electrones pi completamente conjugado. Algunos ejemplos no limitativos de ariilo grupos are fenilo, naftalenilo y anthracenilo. El grupo ariilo puede ser sustituido o insustituido. Cuando es sustituido, Lo(s) grupo(s) sustituidos son preferentemente uno o más, más preferentemente uno, dos o tres, aún más preferentemente uno o dos, seleccionados independientemente del grupo formado por alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxi inferior insustituido, mercapto, (alquilo inferior insustituido) tio, ciano, acilo, tioacilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, y $-NR^{18}R^{19}$, con R^{18} y R^{19} según se los ha definido. Preferentemente, el grupo ariilo es opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, hidroxilo, mercapto, ciano, N-amido, mono o dialquilamino, carboxi, o N-sulfonamido.

"Heteroarilo" se refiere a un grupo en anillo monocíclico o fusionado (es decir, anillos que comparten un par de átomos adyacentes) de 5 a 12 átomos de anillo que contiene uno, dos o tres heteroátomos de anillo seleccionados entre N, O, ó S, siendo C los restantes átomos del anillo, y, además, que presentan un sistema de electrones pi completamente conjugado. Algunos ejemplos no limitativos de grupos heteroarilo insustituidos son pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina, purina y carbazol. El grupo heteroarilo puede ser sustituido o insustituido. Cuando es sustituido, el(los) grupo(s) sustituido(s) es(son) preferentemente uno o más, más preferentemente uno, dos o tres, y aún más preferentemente uno o dos, seleccionados independientemente del grupo formado por alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxi inferior insustituido, mercapto, (alquilo inferior insustituido) tio, ciano, acilo, tioacilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, y $-NR^{18}R^{19}$, con R^{18} y R^{19} según se los ha definido. Preferentemente, el grupo heteroarilo es opcionalmente sustituido

con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, hidroxilo, mercapto, ciano, N-amido, mono o dialquilamino, carboxi, o N-sulfonamido.

"Heteroalíclico" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o fusionado que presenta en el(los) anillo(s) de 5 a 9 átomos de anillo en los que uno o dos átomos de anillo son heteroátomos seleccionados entre N, O, o $S(O)_n$ (donde n es un número entero entre 0 y 2), siendo C los restantes átomos del anillo. Los anillos pueden también tener una o más doble ligaduras. Sin embargo, los anillos no presentan un sistema de electrones pi completamente conjugado. Algunos ejemplos no limitativos de grupos heteroalíclicos insustituídos son pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, tiomorfolino, homopiperazino, y similares. El anillo heteroalíclico puede ser sustituido o insustituido. Cuando es sustituido, el(los) grupo(s) sustituido(s) es(son) preferentemente uno o más, más preferentemente uno, dos o tres, aún más preferentemente uno o dos, seleccionados independientemente del grupo formado por alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxi inferior insustituido, mercapto, (alquilo inferior insustituido)tio, ciano, acilo, tioacilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, y $-NR^{18}R^{19}$, con R^{18} y R^{19} según se los ha definido. Preferentemente, el grupo heteroalíclico está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, hidroxilo, mercapto, ciano, N-amido, mono o dialquilamino, carboxi, o N-sulfonamido.

Preferentemente, el grupo heteroalíclico es opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, hidroxilo, mercapto, ciano, N-amido, mono o dialquilamino, carboxi, o N-sulfonamido.

"Heterociclo" significa un radical cíclico saturado de 3 a 8 átomos de anillo en los que uno o dos átomos de anillo son heteroátomos seleccionados entre N, O, ó $S(O)_n$ (donde n es un número entero entre 0 y 2), siendo C los restantes átomos de anillo, donde uno o dos átomos de C pueden opcionalmente ser reemplazados por un grupo carbonilo. El anillo heterocíclico puede ser opcionalmente sustituido

independientemente con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados entre alquilo inferior opcionalmente sustituido (sustituido con 1 ó 2 sustituyentes seleccionados independientemente entre carboxi o éster), haloalquilo, cianoalquilo, halo, nitro, ciano, hidroxí, alcoxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, aralquilo, heteroaralquilo, -COR (donde R es alquilo) o -COOR donde R es (hidrógeno o alquilo). Más específicamente el término heterocíclico comprende, pero no se limita a, tetrahidropirano, 2,2-dimetil-1,3-dioxolano, piperidino, N-metilpiperidin-3-ilo, piperazino, N-metilpirrolidin-3-ilo, 3-pirrolidino, morfolino, tiomorfolino, tiomorfolino-1-óxido, tiomorfolino-1,1-dióxido, 4-etiloxycarbonilpiperazino, 3-oxopiperazino, 2-imidazolidona, 2-pirrolidinona, 2-oxohomopiperazino, tetrahidropirimidin-2-ona, y derivados de los mismos. Preferentemente, el grupo heterociclo es opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, alquilo inferior insustituido, alquilo inferior sustituido con carboxi, éster hidroxí, mono o dialquilamino.

"Hidroxí" se refiere a un grupo -OH

"Alcoxi" se refiere tanto a un grupo -O-(alquilo insustituido) como a un grupo -O-(cicloalquilo insustituido). Entre los ejemplos representativos se incluyen, sin limitación, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, ciclopropiloxi, ciclobutiloxi, ciclopentiloxi, ciclohexiloxi, y similares.

"Arioxi" se refiere tanto a un grupo -O-arilo como a un grupo -O-heteroarilo, según se ha definido. Entre los ejemplos representativos se incluye, sin limitación, fenoxi, piridiniloxi, furaniloxi, tieniloxi, pirimidiniloxi, piraziniloxi, y similares, y derivados de los mismos.

"Mercapto" se refiere a un grupo -SH.

"Alquiltio" se refiere tanto a un grupo -S-(alquilo insustituido) como a un grupo -S-(cicloalquilo insustituido). Entre los ejemplos representativos se incluyen, sin limitación, por ejemplo, metiltio, etiltio, propiltio, butiltio, ciclopropiltio, ciclobutiltio, ciclopentiltio, ciclohexiltio, y similares.

"Aritio" se refiere tanto a un grupo -S-arilo como a un grupo -S-heteroarilo, según se ha definido. Entre los ejemplos representativos se incluye, sin limitación, feniltio, piridiniltio, furaniltio, tieniltio, pirimidiniltio, y similares y derivados de los mismos.

"Acilo" se refiere a un grupo -C(O)-R", donde R" se selecciona del grupo formado

por hidrógeno, alquilo inferior insustituido, trihalometilo, cicloalquilo insustituido, arilo opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo formado por los grupos alquilo inferior insustituido, trihalometilo, alcoxi inferior insustituido, halo y $-NR^{18}R^{19}$, heteroarilo (unido a través de un átomo de carbono del anillo) opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo formado por los grupos alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, alcoxi inferior insustituido, halo y $-NR^{18}R^{19}$ y heteroalíclico (unido a través de un átomo de carbono del anillo) opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo formado por los grupos alquilo inferior insustituido, trihaloalquilo, alcoxi inferior insustituido, halo y $-NR^{18}R^{19}$. Grupos acilo representativos incluyen, sin limitación, a acetilo, trifluoroacetilo, benzoilo, y similares

"Aldehído" se refiere a un grupo acilo en el cual R" es hidrógeno.

"Tioacilo" se refiere a un grupo $-C(S)-R$ ", con R" según se ha definido.

"Éster" se refiere a un grupo $-C(O)O-R$ " con R" según se ha definido excepto que R" no puede ser hidrógeno.

Grupo "acetilo" se refiere a un grupo $-C(O)CH_3$.

Grupo "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, preferentemente flúor o cloro.

Grupo "trihalometilo" se refiere a un grupo $-CX_3$ donde X es un grupo halo según se ha definido.

Grupo "trihalometansulfonilo" se refiere a grupos $X_3CS(=O)_2-$ con X según se los ha definido.

"Ciano" se refiere a un grupo $-C\equiv N$

"Metilendioxi" se refiere a un grupo $-OCH_2O-$ donde los dos átomos de oxígeno están unidos a átomos de carbono adyacentes.

Grupo "etilendioxi" se refiere a un grupo $-OCH_2CH_2O-$ donde los dos átomos de oxígeno átomos están unidos a átomos de carbono adyacentes.

"S-sulfonamido" se refiere a un grupo $-S(O)_2NR^{18}R^{19}$, con R^{18} y R^{19} según se ha definido.

"N-sulfonamido" se refiere a un grupo $-NR^{18}S(O)_2R^{19}$, con R^{18} y R^{19} según se ha definido.

"O-carbamilo" grupo se refiere a un grupo $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ con R^{18} y R^{19} según se ha definido.

"N-carbamilo" se refiere a un grupo $\text{R}^{18}\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{19}-$, con R^{18} y R^{19} según se ha definido.

"O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo $-\text{OC}(\text{S})\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ con R^{18} y R^{19} según se ha definido.

"N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo $\text{R}^{18}\text{OC}(\text{S})\text{NR}^{19}-$, con R^{18} y R^{19} según se ha definido.

"Amino" se refiere a un grupo $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, donde R^{18} y R^{19} son ambos hidrógeno.

"C-amido" se refiere a un grupo $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ con R^{18} y R^{19} según se ha definido.

"N-amido" se refiere a un grupo $\text{R}^{18}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{19}-$, con R^{18} y R^{19} según se ha definido.

"Nitro" se refiere a un grupo $-\text{NO}_2$.

"Haloalquilo" significa un grupo alquilo insustituido, preferentemente alquilo inferior insustituido según se los ha definido, que es sustituido con uno o más átomos de halógeno, iguales o diferentes, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$, y similares.

"Aralquilo" significa alquilo insustituido, preferentemente alquilo inferior insustituido según se los ha definido, que es sustituido con un grupo arilo según se los ha definido, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{fenilo}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{fenilo}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{fenilo}$, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{fenilo}$, y similares y derivados de los mismos.

Grupo "heteroaralquilo" significa alquilo insustituido, preferentemente alquilo inferior insustituido según se los ha definido, que es sustituido con un grupo heteroarilo, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{piridinilo}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{pirimidinilo}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{imidazolilo}$, y similares, y derivados de los mismos.

"Monoalquilamino" significa un radical $-\text{NHR}$ donde R es un grupo alquilo insustituido o un grupo cicloalquilo insustituido se los ha definido, por ejemplo, metilamino, (1-metiletil)amino, ciclohexilamino, y similares.

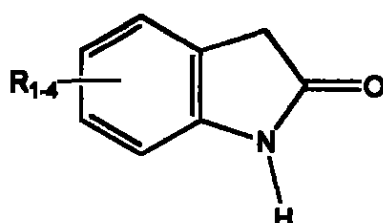
"Dialquilamino" significa un radical $-\text{NRR}$ donde cada uno de los R es independientemente un grupo alquilo insustituido o un grupo cicloalquilo insustituido

según se los ha definido, por ejemplo, dimetilamino, dietilamino, (1-metiletil)-etilamino, ciclohexilmetilamino, ciclopentilmetilamino, y similares.

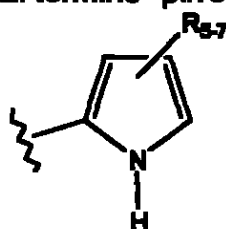
"Cianoalquilo" significa un grupo alquilo insustituido, preferentemente alquilo inferior insustituido según se los ha definido, que es sustituido con 1 ó 2 grupos ciano.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descritos subsecuentemente pueden ocurrir pero no lo harán necesariamente, y que la descripción incluye instancias donde ocurre el evento o circunstancia e instancias en las que no lo hace. Por ejemplo, "grupo heterociclo opcionalmente sustituido con un grupo alquilo" significa que el alquilo puede estar presente pero no es necesario, y la descripción incluye situaciones donde el grupo heterociclo se encuentra sustituido con un grupo alquilo y situaciones donde el grupo heterociclo no está sustituido con el grupo alquilo.

Los términos "2-indolinona", "indolin-2-ona" y "2-oxindol" aquí se usan en forma intercambiable para referirse a moléculas que tienen la estructura química:



El término "pirrol" se refiere a moléculas que tienen la estructura química:



Los términos "pirrol sustituido 2-indolinona" y "3-pirrolidenil-2-indolinona" aquí se usan en forma intercambiable para referirse a compuestos químicos que tienen la estructura general que se muestra en la Fórmula (I).

Los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o en la secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos

en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno del otro se denominan "diasterómeros" y aquellos que no son imágenes especulares superponibles entre sí se denominan "enantiómeros". Por ejemplo, cuando un compuesto tiene un centro asimétrico que está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Se puede caracterizar un enantiómero por la configuración absoluta de sus centros asimétricos que está descrita por las reglas de secuenciación R- y S- de Cahn y Prelog, o por la forma en que las moléculas hacen rotar el plano de la luz polarizada y se designan como dextrorrotatorias o levorrotatorias (es decir, respectivamente como isómeros (+)- ó (-)-). Un compuesto quiral puede existir ya sea como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se llama una "mezcla racémica".

Los compuestos de esta invención pueden poseer uno o más centros asimétricos; por lo tanto se pueden producir compuestos con esas características como estereoisómeros (R)- o (S)- individuales o como mezclas de los mismos. Por ejemplo, si en un compuesto de fórmula (I), el sustituyente R⁶ es 2-hidroxietilo, entonces el carbono al cual el grupo oxhidrilo está unido es un centro asimétrico y por lo tanto el compuesto de fórmula (I) puede existir como un estereoisómero (R)- o (S)-. A no ser que se indique de otra manera, la descripción o denominación de un compuesto en particular en la especificación y cláusulas incluye tanto a los enantiómeros individuales como a las mezclas, (racémicas o no), de los mismos. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de estereoisómeros son bien conocidos en el arte (véase la exposición en el Capítulo 4^{to} de "Advanced Organic Chemistry", 4^a edición J. March, John Wiley y Sons, New York, 1992).

Los compuestos de fórmula (I) pueden mostrar los fenómenos de isomería estructural y tautomería. Por ejemplo, los compuestos descritos aquí pueden adoptar una configuración E o Z con respecto la doble unión que conecta la unidad 2-indolinona a la unidad pirrol o pueden ser una mezcla de E y Z. Esta invención abarca cualquier forma estructural tautomérica o isomérica y mezclas de los mismos que tenga la capacidad de modular la actividad de RTK, CTK y/o STK y no se encuentra limitada a

cualquier forma estructural tautomérica o isomérica.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de uno o más de los compuestos aquí descritos, o sales fisiológica/farmacéuticamente aceptables o prodrogas de las mismas, con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológica/farmacéuticamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

El compuesto de fórmula (I) también puede actuar como una prodroga. Una "prodroga" se refiere a un agente que se convierte *in vivo* a la droga de origen. Frecuentemente las prodrogas son útiles porque, en algunas situaciones, pueden ser más fáciles de administrar que la droga de origen. Por ejemplo, pueden ser biodisponibles por administración oral mientras que la droga de origen no lo es. La prodroga también puede tener una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas en comparación con la droga de origen. Un ejemplo, sin limitación, de una prodroga podría ser un compuesto de la presente invención que es administrado como un éster (la "prodroga") para facilitar la transmisión a través de la membrana celular donde la solubilidad en agua se opone a la movilidad, pero luego, una vez dentro de la célula, donde la solubilidad en agua es beneficiosa, es hidrolizado en forma metabólica al ácido carboxílico, es decir la entidad activa.

Un ejemplo adicional de una prodroga podría ser un polipéptido de cadena corta, por ejemplo y sin limitación, un polipéptido de entre 2 y 10 aminoácidos, unido a través de un grupo amino terminal a un grupo carboxilo de un compuesto de esta invención, donde el polipéptido es hidrolizado o metabolizado *in vivo* para liberar las moléculas activas. Las prodrogas de un compuesto de fórmula (I) se hallan dentro del alcance de la presente invención.

Adicionalmente, se contempla que un compuesto de fórmula (I) podría ser metabolizado por enzimas en el cuerpo de un organismo tal como un ser humano para generar un metabolito que pueda modular la actividad de las proteína quinasas. Dichos metabolitos se hallan dentro del alcance de la presente invención.

Según se usa aquí, un "vehículo fisiológica/farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado.

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia inerte que se agrega a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Algunos ejemplos de excipientes no limitantes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Según se usa aquí, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficiencia biológica y propiedades del compuesto de origen. Dichas sales incluyen:

(i) sal de adición ácida que se obtiene por reacción de la base libre del compuesto de origen con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, y ácido perclórico y similares, o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido (D) o (L) málico, ácido maleico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico y similares, preferentemente del ácido clorhídrico o del ácido (L)-málico tal como la sal L-malato de 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-ácido carboxílico(2-dietilaminoetil)amida; o

(2) sales formadas cuando se reemplaza un protón ácido presente en el compuesto de origen ya sea con un ion metálico, por ejemplo, un ion metálico alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion aluminio; o se coordina con una base orgánica como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares.

"PK" se refiere a un proteína receptora de tirosina quinasa (RTKs), no receptora o tirosina quinasa "celular" (CTKs) y serina-treonina quinasas (STKs).

"Método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea determinada incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos ya sea conocidos por, o fácilmente desarrollados a partir de, maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por practicantes de las artes química, farmacéutica, biológica, bioquímica y médica.

"Modulación" o "modular" se refiere a la alteración de la actividad catalítica de las RTK, CTK y STK. Modular se refiere, en particular, a la activación de la actividad

catalítica de las RTK, CTK y STK, preferentemente a la activación o inhibición de la actividad catalítica de las RTK, CTK y STK, dependiendo de la concentración del compuesto o sal a la cual se expone la RTK, CTK o STK o, más preferentemente, la inhibición de la actividad catalítica de las RTK, CTK y STK.

"Actividad catalítica" se refiere a la proporción de fosforilación de la tirosina bajo la influencia, directa o indirecta, de las RTK y/o CTK o la fosforilación de serina y treonina bajo la influencia, directa o indirecta, de las STK.

"Poner en contacto" se refiere a poner juntos un compuesto de esta invención y una PK objetivo de tal manera que el compuesto puede afectar la actividad catalítica de la PK, ya sea directamente, es decir, por interacción con la misma quinasa, o indirectamente, es decir, por interacción con otras moléculas respecto de las que la actividad catalítica de la quinasa es dependiente. Se puede conseguir dicho "poner en contacto" *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo, una cápsula de petri o similares. En un tubo de ensayo, el poner en contacto puede incluir solamente un compuesto y una PK de interés o puede incluir células completas. También se pueden mantener o cultivar las células en discos de cultivo de células y ponerlos en contacto con un compuesto en dicho ambiente. En este contexto, se puede intentar la determinación de la capacidad de afectar un trastorno relacionado con PK de un compuesto en particular, es decir, la IC₅₀ del compuesto, definida abajo, antes del uso *in vivo* de los compuestos, con organismos vivientes más complejos. Para células fuera del organismo, existen muchos métodos para poner las PK en contacto con los compuestos y son bien conocidos por aquellos experimentados en el arte, incluyendo, pero sin limitarse a, la microinyección celular directa y muchas técnicas de vehículo transmembrana.

"*In vitro*" se refiere a procedimientos que se llevan a cabo en un ambiente artificial tal como, por ejemplo y sin limitación, en un tubo de ensayo o en un medio de cultivo.

"*In vivo*" se refiere a procedimientos que se llevan a cabo dentro de un organismo viviente como, sin limitación, un ratón, una rata o un conejo.

Tanto "trastorno relacionado con PK" como "trastorno impulsado por PK" y "actividad PK anormal", se refieren todos a una condición caracterizada por una actividad catalítica PK inapropiada, es decir, baja, o, más comúnmente, alta, donde la

PK en particular puede ser una RTK, una CTK o una STK. La actividad catalítica inapropiada puede surgir como resultado de ya sea: (1) expresión de la PK en células que normalmente no expresan PKs, (2) expresión aumentada de la PK que conlleva a una proliferación celular no deseada, diferenciación y/o crecimiento, o, (3) expresión disminuida de la PK que conlleva a reducciones no deseadas en la proliferación celular, diferenciación y/o crecimiento. La sobreactividad de una PK se refiere ya sea a la amplificación del gen que codifica a una PK en particular o la producción de un nivel de actividad PK que se puedan correlacionar con una proliferación celular, diferenciación y/o trastorno del crecimiento (esto es, si a medida que aumenta el nivel de la PK, aumenta la severidad de uno o más de los síntomas del trastorno celular). La subactividad es, por supuesto, la inversa, donde aumenta la severidad de uno o más de los síntomas de un trastorno celular a medida que disminuye el nivel de la actividad PK.

"Tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o anular un trastorno celular mediado por PK y/o sus síntomas concomitantes. Con respecto en particular al cáncer, dichos términos simplemente significan que la expectativa de vida de un individuo afectado con un cáncer aumentará, o que se reducirán uno o más de los síntomas de la enfermedad.

"Organismo" se refiere a cualquier entidad viviente que comprende al menos una célula. Un organismo viviente puede ser tan simple como, por ejemplo, una única célula eucariota o tan complejo como un mamífero, que incluye a un ser humano.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad del compuesto que está siendo administrando que aliviará en alguna medida uno o más de los síntomas del trastorno que está siendo tratado. Con referencia al tratamiento de cáncer, una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad que tiene el efecto de:

- (1) reducir el tamaño del tumor;
- (2) inhibir (es decir, hacer más lenta en alguna medida, y preferentemente detener) la metástasis del tumor;
- (3) inhibir en alguna medida (es decir, hacer más lenta en alguna medida, y preferentemente detener) el crecimiento del tumor, y/o,
- (4) aliviar en alguna medida (o, preferentemente, eliminar) uno o más síntomas asociados con el cáncer.

"Monitorear" significa observar o detectar el efecto de poner en contacto un compuesto con una célula que expresa una PK en particular. El efecto observado o detectado puede ser un cambio del fenotipo celular, de la actividad catalítica de una PK o un cambio en la interacción de una PK con un compañero de unión natural. Las técnicas para observar o detectar dichos efectos son bien conocidas en el arte.

En un aspecto final de la presente invención, el efecto al que se hace referencia arriba se selecciona de entre un cambio o una ausencia de cambio en el fenotipo celular, un cambio o ausencia de cambio en la actividad catalítica de dicha proteína quinasa o un cambio o ausencia de cambio en la interacción de dicha proteína quinasa con un compañero de unión natural.

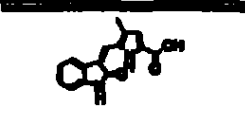
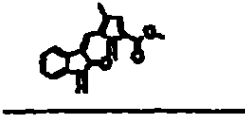
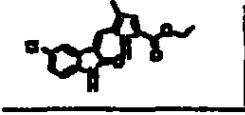
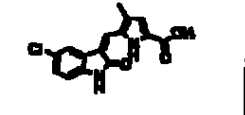
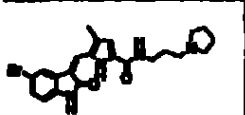
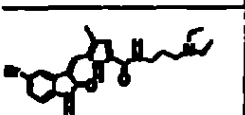
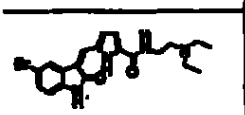
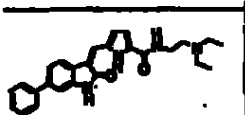
"Fenotipo celular" se refiere a la apariencia externa de una célula o tejido o a la función biológica de la célula o tejido. Algunos ejemplos no limitantes del fenotipo celular son el tamaño, el crecimiento celular, la proliferación celular, la diferenciación celular, la supervivencia celular, la apoptosis, y la toma y uso de nutrientes. Dichas características fenotípicas se pueden medir usando técnicas bien conocidas en el arte.

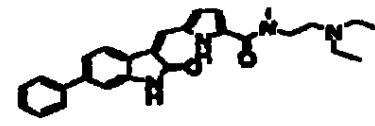
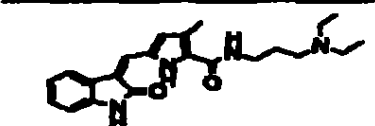
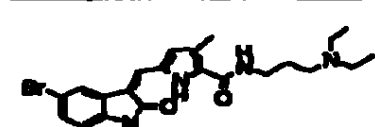
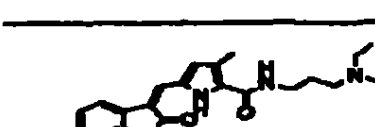
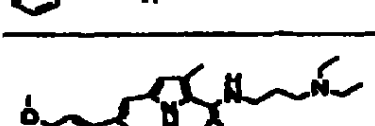
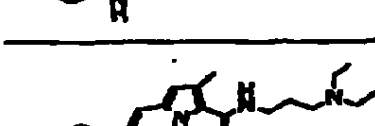
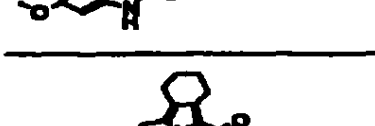
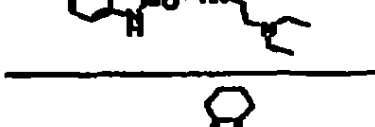
"Compañero de unión natural " se refiere a un polipéptido que une una PK en particular a una célula. Los compañeros de unión natural pueden desempeñar un papel en la propagación de una señal en un proceso de transducción de señal mediado por PK. Un cambio en la interacción del compañero de unión natural con la PK se puede manifestar en sí como una concentración aumentada o disminuida del complejo PK/compañero de unión natural y, como resultado, como un cambio observable de la capacidad de la PK para mediar la transducción de la señal.

En la Tabla I siguiente se muestran compuestos representativos de la presente invención.

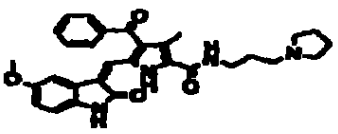
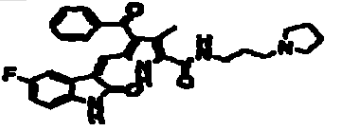
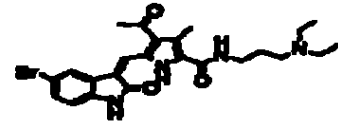
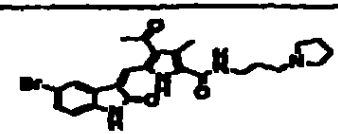
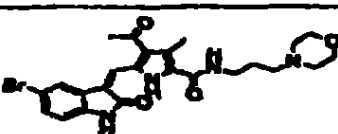
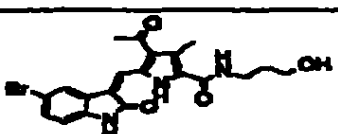
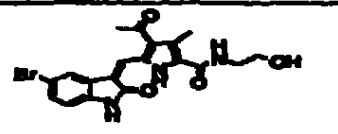
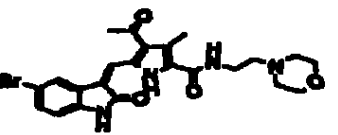
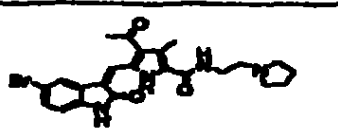
TABLA 1

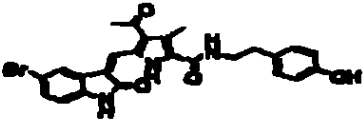
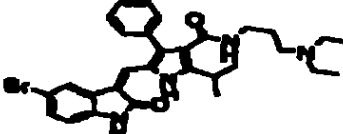
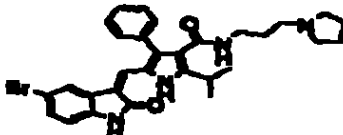
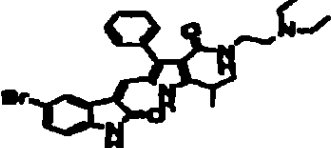
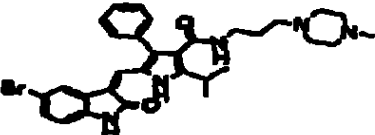
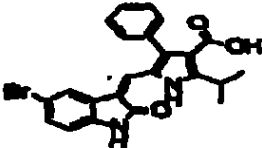
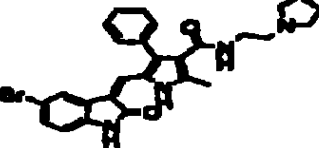
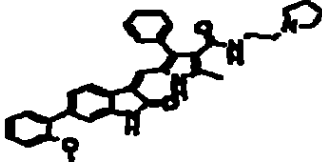
Ejemplo	Estructura	Nombre
1		Ácido 4-Metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
2		Ácido 4-Metil-5-(1-metil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

3		Metiléster del ácido 4-metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
4		Etiléster del ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
5		Ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
6		(3-pirrolidin-1-íl-propil)amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
7		(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
8		(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
9	  	(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(2-Oxo-8-fenil-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

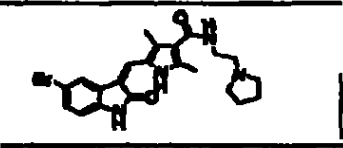
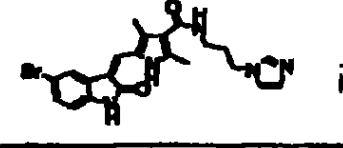
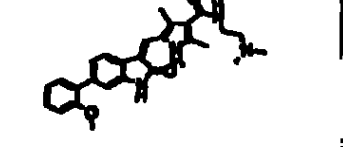
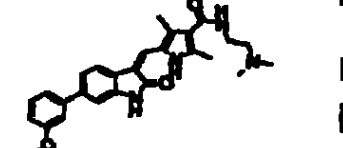
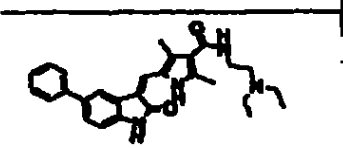
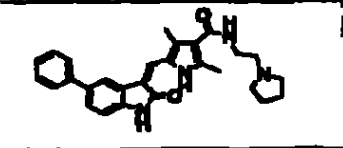
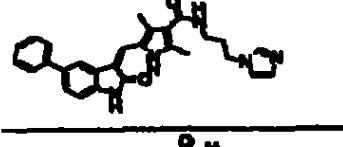
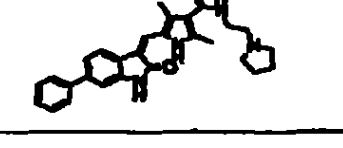
10		(2-diethylaminoetil)-metil-amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
11		(2-diethylaminoetil)metilamida del ácido 5-(2-Oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
12		(3-diethylaminopropil)amida del ácido 3-Metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
13		(3-diethylamino-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
14		(3-diethylaminopropil)amida del ácido 3-Metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
15		(3-diethylamino-propil)amida del ácido 5-(5-Metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
16		(3-diethylamino-propil)amida del ácido 5-(6-Metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
17		(2-diethylamino-etil)amida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
18		(3-diethylamino-propil)amida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico

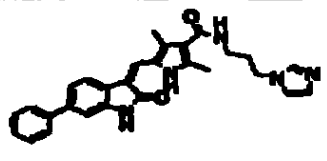
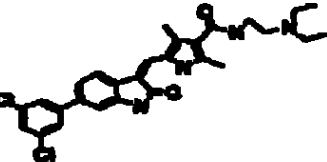
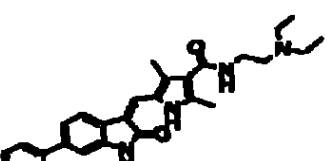
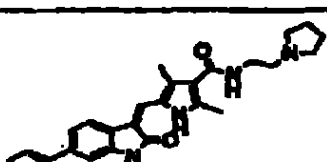
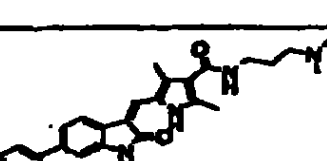
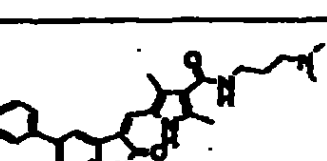
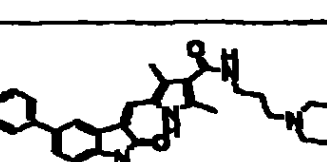
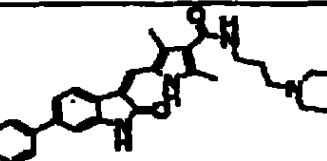
19		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
20		(2-diethylaminoetil)amida del ácido 3-(2-Oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
21		(3-diethylaminopropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
22		(3-morfolin-4-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
23		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-3-metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
24		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
25		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-3-metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
26		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(6-metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

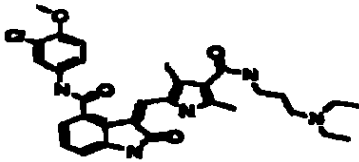
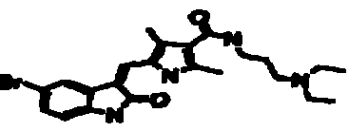
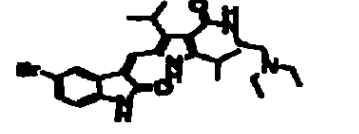
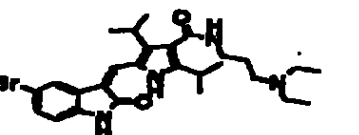
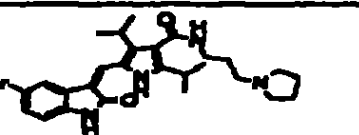
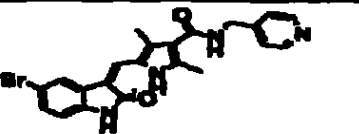
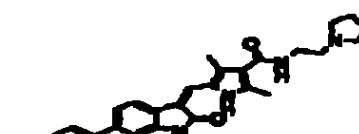
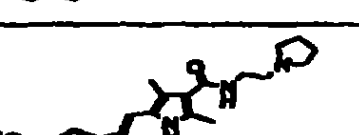
27		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
28		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
29		(3-dietilaminopropil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
30		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
31		(3-morfolin-4-ilpropil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
32		(3-hidroxdpropil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
33		(3-hidroxdetil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
34		(2-morfolin-4-iletil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
35		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

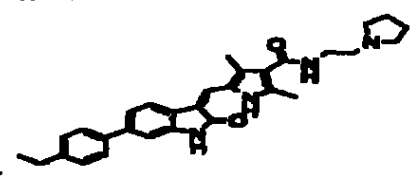
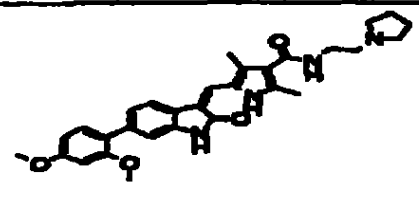
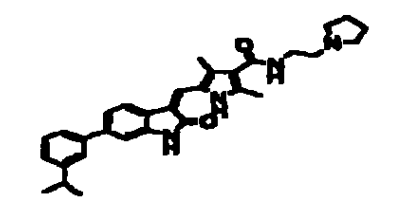
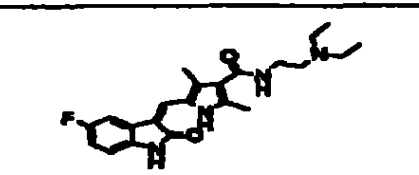
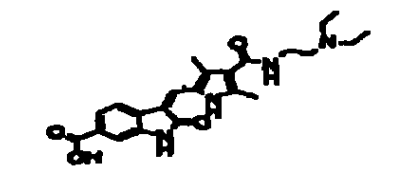
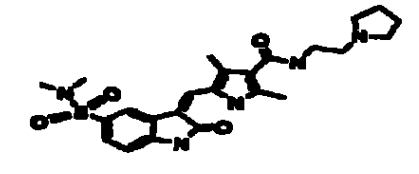
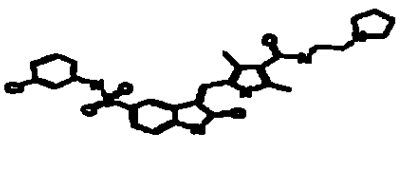
36		[2-(4-hidroxifenil)etil]amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
37		(3-diethylaminopropil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
38		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
39		(2-diethylaminoetil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
40		[3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
41		Ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
42		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
43		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-[3-(2-Metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

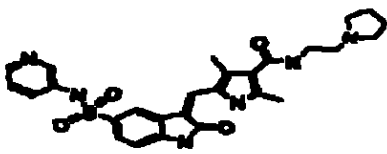
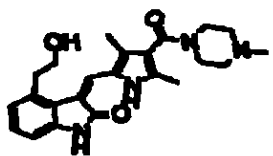
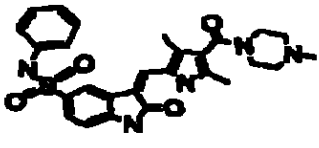
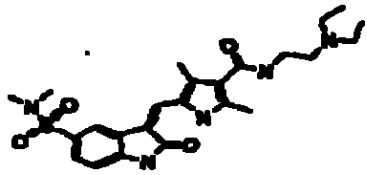
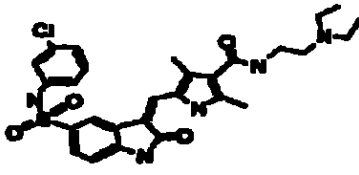
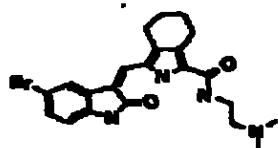
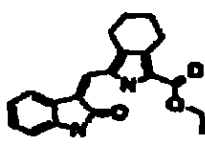
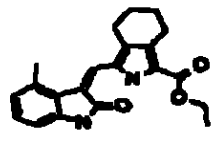
44		(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
45		(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-[6-(2-Metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
46		Etiléster del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
47		(3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
48		(2-dimetilamino-etil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
49		(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
50		(2-dimetilamino-etil)amida del ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
51		(2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

52		(2-pirrolidin-1-il-etil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
53		(3-imidazol-1-il-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
54		(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-[6-(2-Metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
55		(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-[6-(3-Metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
56		(2-diethylaminoetil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
57		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
58		(3-imidazol-1-ilpropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
59		2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico ácido (2-diethylaminoetil)amida
60		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

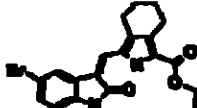
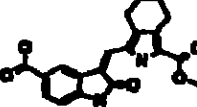
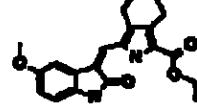
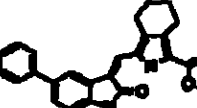
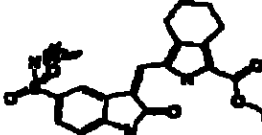
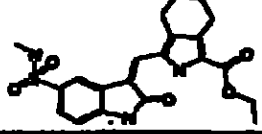
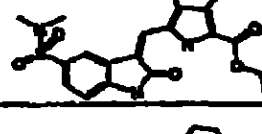
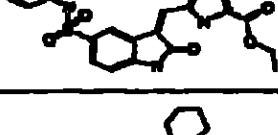
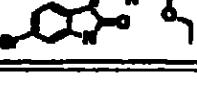
61		(3-imidazol-1-ylpropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
62		(2-diethylaminoetil)amida del ácido 5-[8-(3,5-Diclorofenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
63		(2-diethylaminoetil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
64		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
65		(3-dimetilaminopropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
66		(3-dimetilaminopropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
67		(3-diethylaminopropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
68		(3-diethylaminopropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

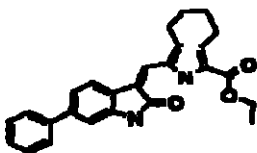
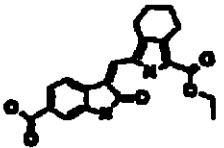
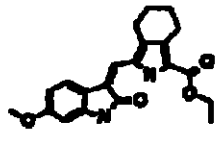
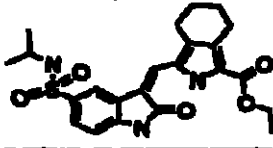
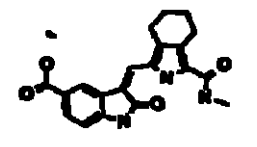
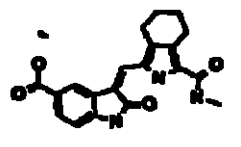
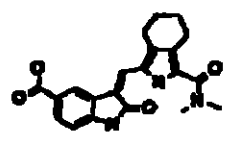
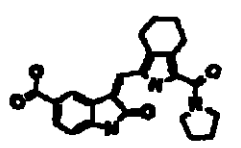
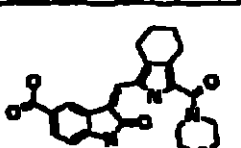
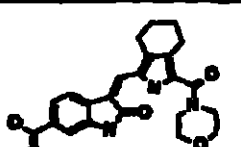
69		(3-cloro-4-metoxifenil)amida del ácido 3-[4-(3-Dietilaminopropilcarbamoyl)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetilene]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-4-carboxílico
70		(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
71		(2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico
72		(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico
73		(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico
74		(piridin-4-ilmetil)-amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
75		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-[6-(4-Butilfenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
76		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-[6-(5-Isopropil-2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

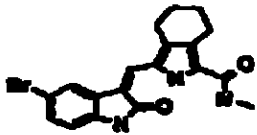
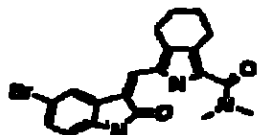
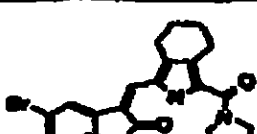
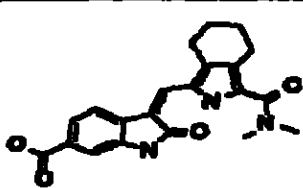
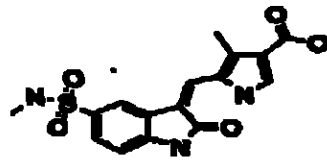
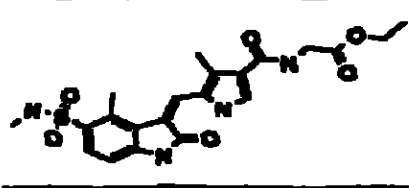
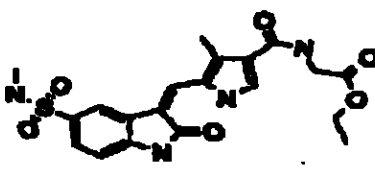
77		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-[6-(4-Etilfenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
78		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-[6-(2,4-Dimetoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
79		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-[6-(3-Isopropilfenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
80		(2-diethylamino-etil)amida del ácido 5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
81		Ácido 3-[4-(2-Diethylaminoetilcarbamoyl)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetilene]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico
82		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-(5-Dimetilsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
83		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-[5-(3-Clorofenilsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

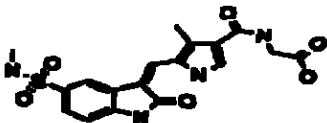
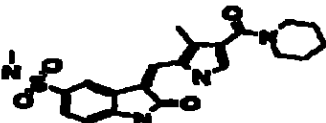
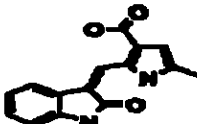
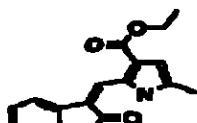
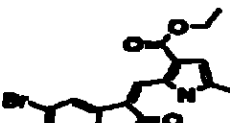
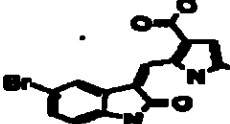
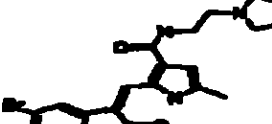
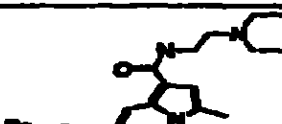
84		(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-[2-oxo-5-(piridin-3-il sulfamoi)-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
85		3-[3,5-Dimetil-4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetilene]-4-(2-hidroxietil)-1,3-dihidroindol-2-ona
86		Fenilamida del ácido 3-[3,5-Dimetil-4-(4-metilpiperazin-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetilene]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico
87		(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(5-Dimetilsulfamoi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
88		(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-[5-(3-Clorofenilsulfamoi)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
89		(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-Isoindol-1-carboxílico
90		Etiléster del ácido 3-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-Isoindol-1-carboxílico
91		Etiléster del ácido 3-(4-metil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-Isoindol-1-carboxílico

43
45

92		Etiléster del ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
93		Ácido 3-(3-etoxycarbonyl-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ímetilene)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
94		Etiléster del ácido 3-(5-metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
95		Etiléster del ácido 3-(2-Oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
96		etiléster del ácido 3-(2-Oxo-5-sulfamoyl-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
97		etiléster del ácido 3-(5-metilsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
98		etiléster del ácido 3-(5-dimetilsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
99		etiléster del ácido 3-(2-Oxo-5-fenilsulfamoyl-1,2-dihidroindol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
100		Etiléster del ácido 3-(6-Bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico

101		Etiléster del ácido 3-(2-Oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico
102		Ácido 3-(3-Etoxycarbonyl-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-ilmetilene)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico
103		Etiléster del ácido 3-(6-metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico
104		Etiléster del ácido 3-(5-Isopropilsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico
105		Ácido 3-(3-metilcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-ilmetilene)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
106		Ácido 3-(3-dimetilcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-ilmetilene)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
107		Ácido 2-oxo-3-[3-(pírolidin-1-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-ilmetilene]-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
108		Ácido 3-[3-(Morfolin-4-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-ilmetilene]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
109	 	Ácido 3-[3-(Morfolin-4-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-ilmetilene]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico

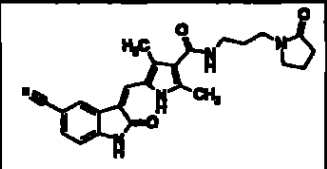
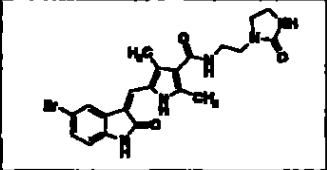
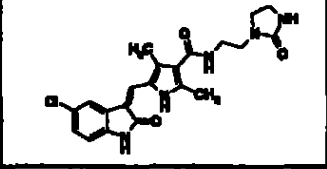
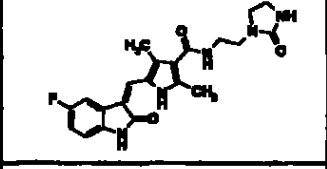
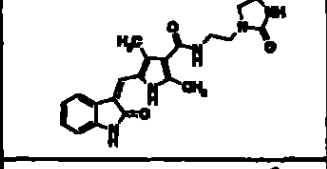
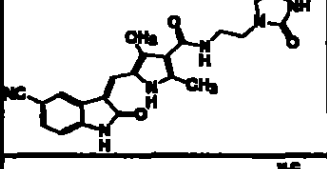
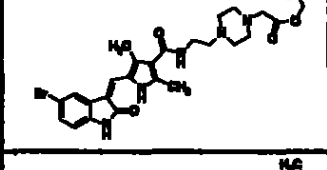
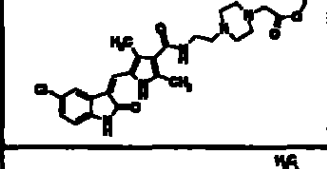
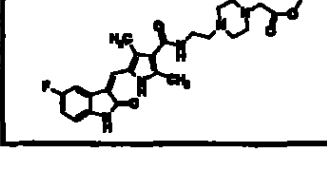
110		Metilamida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidro-Indol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
111		Dimetilamida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidro-Indol-3-íldenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
112		5-Bromo-3-[3-(pirrolidin-1-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ímetilen]-1,3-dihidro-indol-2-ona
113		5-Bromo-3-[3-(morfolin-4-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ímetilen]-1,3-dihidro-Indol-2-ona
114		Ácido 3-(3-Dimetilcarbamoil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ímetilen)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-Indol-6-carboxílico
115		Ácido 4-Metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-Indol-3-íldenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
116		Etiléster del ácido {[4-Metil-5-(4-metil-5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-íldenemetil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético
117		etiléster del ácido {[4-Metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-íldenemetil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético

118		Ácido [(4-Metil-5-(5-metilsulfamoi)-2-oxo-1,2-dihidro-Indol-3-Iliden-metil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino)-acético
119		Metilamida del ácido 3-[3-Metil-4-(piperidin-1-carbonil)-1H-pirrol-2-Ilmetilen]-2-oxo-2,2-dihidro-1H-Indol-5-sulfónico
120		Ácido 5-Metil-2-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-Ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
121		Etiléster del ácido 5-Metil-2-(2-oxo-1,2-dihidro-Indol-3-Iliden-metil)-1H-pirrol-3-carboxílico
122		etiléster del ácido 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroIndol-3-Ilidenemetil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico
123		Ácido 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroIndol-3-Iliden-metil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico
124		(2-pirolidin-1-iletil)-amida del ácido 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroIndol-3-Ilidenemetil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico
125		(2-dietilaminoetil)-amida del ácido 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroIndol-3-Iliden-metil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

126		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)-amide	381 [M+1]	
127		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)-amide	415 [M+1]	
128		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)-amide	379 [M+1]	
129		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)-amide	387 [M+1]	
130		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)-amide	413 [M+1]	
131		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)-amide	353 [M+1]	
132		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)-amide	371 [M+1]	

133		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	389 [M-1]	
134		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	383 [M-1]	
135		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	385 [M-1]	
136		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	500 [M+1] 502 [M+1]	
137		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	454 [M-1]	
138		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	438 [M-1]	
139		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	422 [M+1]	
140		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	447 [M+1]	
141		Trifluoroacetate 4-[2-((5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium; trifluoroacetate	486 [M+1] 488 [M+1]	

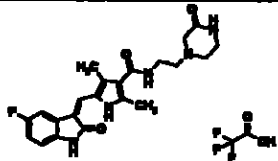
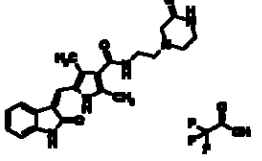
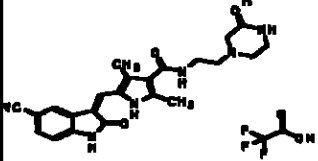
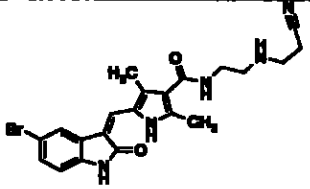
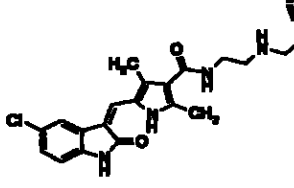
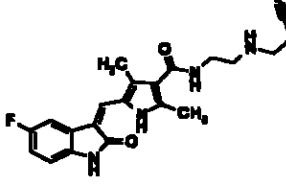
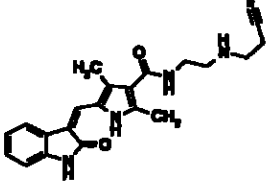
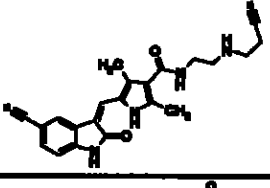
49
51

142		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide	430 [M-1]
143		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-oxo-imidazolidin-1-yl)-ethyl]-amide	470 [M-1] 472 [M-1]
144		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-oxo-imidazolidin-1-yl)-ethyl]-amide	428 [M+1]
145		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-oxo-imidazolidin-1-yl)-ethyl]-amide	412 [M+1]
146		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-oxo-imidazolidin-1-yl)-ethyl]-amide	382 [M-1]
147		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-oxo-imidazolidin-1-yl)-ethyl]-amide	419 [M+1]
148		{4-[2-((5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-piperazin-1-yl)-acetic acid ethyl ester	558 [M+1] 580 [M+1]
149		{4-[2-((5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-piperazin-1-yl)-acetic acid ethyl ester	514 [M+1]
150		{4-[2-((5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-piperazin-1-yl)-acetic acid ethyl ester	498 [M+1]

52

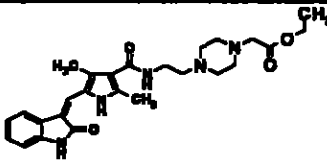
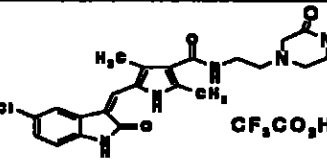
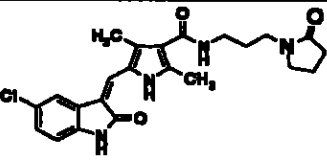
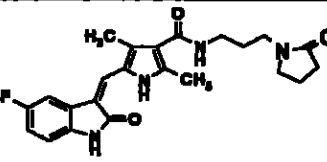
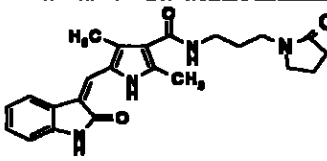
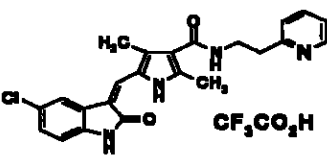
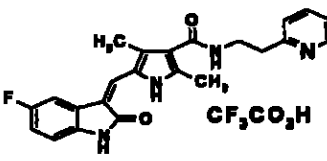
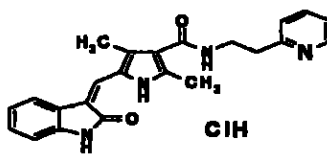
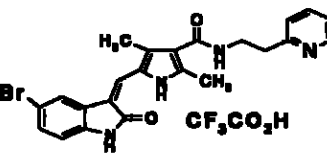
153		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(cyanomethyl-amino)-ethyl]-amide	362 [M-1]
154		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propyl]-amide	511 [M-1] 513 [M-1]
155		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propyl]-amide	469 [M+1]
156		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propyl]-amide	453 [M+1]
157		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propyl]-amide	435 [M+1]
158		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propyl]-amide	460 [M+1]
159		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	443 [M-1] 445 [M-1]

51
53

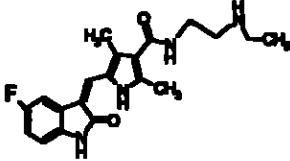
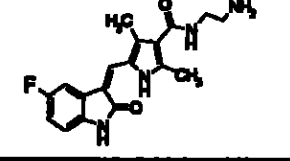
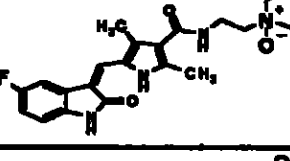
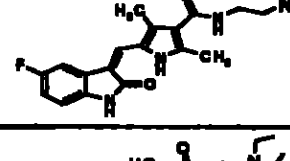
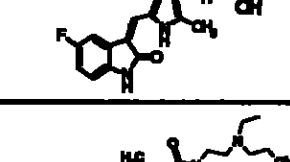
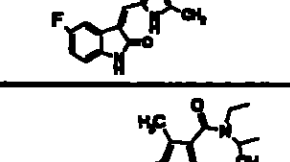
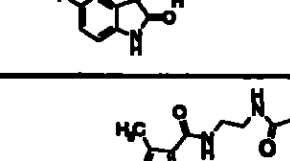
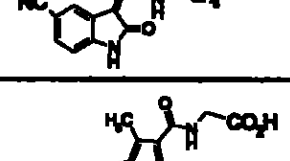
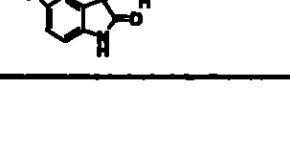
160		Trifluoro-acetate 4-[2-((5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium;	426 [M+1]
161		Trifluoro-acetate 4-[2-((2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium;	408 [M+1]
162		Trifluoro-acetate 4-[2-((5-[5-cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium;	433 [M+1]
163		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-cyano-ethylamino)-ethyl]-amide	454 [M-1] 456 [M-1]
164		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-cyano-ethylamino)-ethyl]-amide	410 [M-1]
165		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-cyano-ethylamino)-ethyl]-amide	394 [M-1]
166		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-cyano-ethylamino)-ethyl]-amide	378 [M-1]
167		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-cyano-ethylamino)-ethyl]-amide	401 [M-1]
168		Trifluoro-acetate 4-[2-((5-[5-chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-	440 [M-1]

168		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	424 [M-1]	
169		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	440 [M-1]	
170		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	484 [M-1] 486 [M-1]	
171		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yridenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	408 [M-1]	
172		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yridenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	422 [M+1]	
173		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	438 [M-1]	
174		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	456 [M+1]	
175		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	488 [M-1] 500 [M-1]	

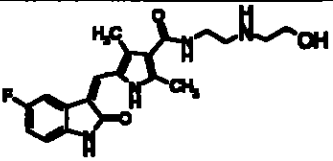
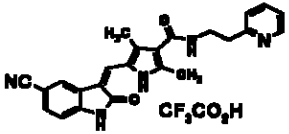
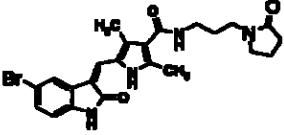
176		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(4-methyl-piperazin-1-yl)-propyl]-amide	422 [M+1]	
177		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(4-methyl-piperazin-1-yl)-propyl]-amide	438 [M-1]	
178		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(4-methyl-piperazin-1-yl)-propyl]-amide	454 [M-1]	
179		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(4-methyl-piperazin-1-yl)-propyl]-amide	498 [M-1] 500 [M-1]	
180		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-benzyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	482 [M-1]	
181		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-benzyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	500 [M-1]	
182		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-benzyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	517 [M-1]	
183		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-benzyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	560 [M-1] 562 [M-1]	

184		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1yl-2-one)-amide	480 [M+1]
185		Trifluoroacetate 4-[2-((5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxyl)amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium	440 [M-1]
186		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1yl-2-one)-amide	
187		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1yl-2-one)-amide	
188		5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1yl-2-one)-amide	
189		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide	
190		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide trifluoroacetate salt	
191		5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide hydrochloride salt	
192		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide trifluoroacetate salt	

55
57

183		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-ethylaminoethyl)-amide
184		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-aminoethyl)-amide
185		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethyl-N-oxoaminoethyl)-amide
186		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-ethyl-N-hydroxy-aminoethyl)-amide
187		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-2-hydroxyethyl)-amide
188		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-ethyl-2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-amide
189		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-ethyl-2-(1-hydroxyethyl)aminoethyl]-amide
200		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-N-acetylaminoethyl)-amide
201		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (carboxymethyl)-amide

56
58

202		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yldenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-hydroxyethylamino)ethyl]-amide
203		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yldenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide trifluoroacetate
204		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yldenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-yl-2-onepropyl)-amide trifluoroacetate

Los números de los compuestos corresponden a los números de los Ejemplos en la sección de Ejemplos. Esto significa que la síntesis del Compuesto 1 de la Tabla 1 se describe en el Ejemplo 1. Los compuestos que se presentan en la Tabla 1 son a título ilustrativo y no deben ser interpretados como una limitación del alcance de la presente invención de manera alguna.

REALIZACIONES PREFERIDAS

Mientras que en el Resumen de la Invención se presentan definiciones más amplias, determinados compuestos de fórmula (I) que se indican a continuación, son los preferidos.

(1) Un grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^1 , R^3 , y R^4 son hidrógeno.

(2) Otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^1 , R^2 , y R^4 son hidrógeno.

(3) Otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^1 , R^2 , y R^3 son hidrógeno.

(4) Otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^2 , R^3 , y R^4 son hidrógeno.

(5) Otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno.

(6) Aún otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^5 , R^6 o R^7 , preferentemente R^5 o R^6 , más preferentemente R^6 es $-\text{COR}^{10}$ donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido, preferentemente hidrógeno o metilo;

n es 2, 3 o 4, preferentemente 2 o 3; y

R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} y R^{14} son independientemente alquilo, más preferentemente alquilo inferior insustituido o R^{13} y R^{14} se combinan para formar un grupo seleccionado entre $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O-(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$, preferentemente R^{13} y R^{14} son independientemente hidrógeno, metilo, etilo, o se combinan para formar morfolin-4-ilo, pirrolidin-1-ilo, piperazin-1-ilo, o 4-metilpiperazin-1-ilo.

Más preferentemente, R^5 o R^6 en (6) above es N-(2-dimetilaminoetil)aminocarbonilo, N-(2-etilaminoetil)-N-metilaminocarbonilo, N-(3-dimetilaminopropil)-aminocarbonilo, N-(2-dietilaminoetil)aminocarbonilo, N-(3-etilaminopropil)aminocarbonilo, N-(3-dietilaminopropil)aminocarbonilo, 3-pirrolidin-1-il-propilaminocarbonilo, 3-morfolin-4-ilpropil-aminocarbonilo, 2-pirrolidin-1-iletilaminocarbonilo, 2-morfolin-4-iletilaminocarbonilo, 2-(4-metilpiperazin-1-il)etilaminocarbonilo, 2-(4-metilpiperazin-1-il)propilaminocarbonilo, 2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etilaminocarbonilo o 2-(3,5-dimetilpiperazin-1-yl)propilaminocarbonilo, aún más preferentemente N-(2-dietilaminoetil)aminocarbonilo o N-(2-etilaminoetil)amino-carbonilo.

(7) Aún otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquel donde R^5 , R^6 o R^7 , preferentemente R^5 o R^6 , más preferentemente R^6 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo, preferentemente alquilo inferior sustituido con hidroxí, arilo, heteroarilo, heteroalícídico, o carboxi, más preferentemente metilo, etilo, propilo o butilo sustituido con hidroxí, arilo, heteroalícídico such as piperidina, piperazina, morfolina y similares, heteroarilo, o carboxi. Aún más preferentemente dentro de este grupo (7), R^5 o R^6 es 2-etoxycarbonilmetil-aminocarbonilo, carboximetilamino-carbonilo, 3-hidroxdpropil-aminocarbonilo, 2-hidroxdetilaminocarbonilo, 3-triazin-1-ilpropilamino-carbonilo,

triazin-1-iletilaminocarbonilo, 4-hidroxi-feniletilaminocarbonilo, 3-imidazol-1-ilpropil-aminocarbonilo, piridin-4-ilmetilaminocarbonilo, 2-piridin-2-iletilaminocarbonilo o 2-imidazol-1-iletilaminocarbonilo.

(8) Aún otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^5 , R^6 o R^7 , preferentemente R^5 o R^6 , más preferentemente R^5 es $-\text{COR}^{10}$ donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo, preferentemente hidrógeno o metilo;

n es 2, 3 o 4, preferentemente 2 o 3; y

R^{12} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo, preferentemente un heterociclo de 5, 6, o 7 miembros que contiene un grupo carbonilo y 1 o 2 átomos de nitrógeno. Preferentemente, R^5 o R^6 es 2-(3-etoxicarbonilmetilpiperazin-1-il)etilaminocarbonilo, 2-(3-oxopiperazin-1-il)etilaminocarbonilo, 2-(imidazolidin-1-il-2-ona)etilaminocarbonilo, 2-(tetrahidropirimidin-1-il-2-ona)etilaminocarbonilo, 2-(2-oxopirrolidin-1-il)etilaminocarbonilo, 3-(4-metilpiperazin-1-il)-propilaminocarbonilo, 3-(3-etoxicarbonilmetilpiperazin-1-il)-propilaminocarbonilo, 3-(3-oxopiperazin-1-il)propil-aminocarbonilo, 3-(imidazolidin-1-il-2-ona)propil-aminocarbonilo, 3-(tetrahidropirimidin-1-il-2-ona)-propilaminocarbonilo, 3-(2-oxopirrolidin-1-il)propilaminocarbonilo, 2-(2-oxohomopiperidin-1-il)etilamino-carbonilo o 3-(2-oxohomopiperidin-1-il)propilaminocarbonilo.

(9) Aún otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^5 , R^6 o R^7 , preferentemente R^5 o R^6 , más preferentemente R^5 es $-\text{COR}^{10}$ donde:

(a) R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo, preferentemente hidrógeno o metilo;

n es 2, 3 o 4, preferentemente 2 o 3; y

R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es cianoalquilo o $-NHCOR^a$ donde R^a es alquilo; o

(b) R^{10} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo que no contiene un grupo carbonilo dentro del anillo. Preferentemente, R^5 o R^6 es 2-(2-cianoetilamino)etilaminocarbonilo, 2-(acetilamino)-etilaminocarbonilo, morfolinocarbonilo, piperidin-1-il-carbonilo, 2-cianometilaminoetilaminocarbonilo o piperidin-1-ilcarbonilo.

(10) Otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^5 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo inferior sustituido con hidroxí, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, carboxi, o $-NR^{16}R^{18}$ donde R^{16} y R^{18} son independientemente hidrógeno o alquilo inferior insustituido, más preferentemente R^5 es 2-[(dietilamino)-2-hidroxi]etilaminocarbonilo, 2-(N-etil-N-2-hidroxi)etilaminocarbonilo, carboximetilamino-carbonilo, o 2-(2-hidroxi)etilamino-carbonilo.

(11) Aún otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^5 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo inferior sustituido con hidroxí, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, carboxi, o $-NR^{16}R^{18}$ donde R^{16} y R^{18} son independientemente hidrógeno o alquilo inferior insustituido; más preferentemente R^5 es [2-(dietilamino)-2-hidroxi]etilaminocarbonilo, 2-(N-etil-N-2-hidroxi)etilamino-carbonilo, carboximetilaminocarbonilo, o 2-(2-hidroxi)etilamino-carbonilo.

(12) Aún otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^5 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ donde R^{12} es $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$ o $-N(OH)R^{13}$

donde R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior insustituido, preferentemente R^5 es 2-(N-hidroxi-N-etilamino)-etilaminocarbonilo o 2-[N⁺(O⁻)(C₂H₅)₂]etil-aminocarbonilo

(13) Aún otro grupo preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde R^6 es $-\text{COR}^{10}$ donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde R^{12} es $-\text{N}^+(\text{O}^-)\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ o $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$ donde R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior insustituido, preferentemente R^6 es 2-(N-hidroxi-N-etilamino)-etilaminocarbonilo o 2-[N⁺(O⁻)(C₂H₅)₂]etil-aminocarbonilo.

(14) En los grupos preferidos anteriores (6)-(13) cuando R^6 es $-\text{COR}^{10}$, entonces un grupo más preferido de compuestos es aquél donde:

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo, preferentemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, o n-butilo, más preferentemente hidrógeno o metilo; y

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ donde R^{17} es hidroxilo, alquilo o arilo, más preferentemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, n-, iso o tert-butilo, fenilo, benzoilo, acetilo o carboxi, aún más preferentemente metilo, hidrógeno o fenilo.

(15) En los grupos preferidos precedentes (6)-(13) cuando R^6 es $-\text{COR}^{10}$, entonces otro grupo más preferido de compuestos es aquél donde R^6 y R^7 se combinan para formar $-(\text{CH}_2)_4-$.

(16) En los grupos preferidos precedentes (6)-(13) cuando R^6 es $-\text{COR}^{10}$, entonces otro grupo más preferido de compuestos es aquél donde:

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo, preferentemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, o n-butilo, más preferentemente hidrógeno o metilo; y

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-C(O)R^{17}$, donde R^{17} es hidroxilo, alquilo o arilo, más preferentemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, n-, iso o tert-butilo, fenilo, benzoilo, acetilo o carboxi, aún más preferentemente metilo, hidrógeno o fenilo.

(17) Dentro de los grupos preferidos y más preferidos precedentes (6)-(16), un grupo aún más preferido de compuestos es aquél donde:

R^1 es hidrógeno, alquilo, $-C(O)NR^8R^9$, cicloalquilo o arilo insustituído, preferentemente hidrógeno, fenilo, 3,4-dimetoxifenilaminocarbonilo, 4-metoxi-3-clorofenil-aminocarbonilo, aún más preferentemente hidrógeno o metilo, más preferentemente hidrógeno;

R^2 es ciano, hidrógeno, halo, alcoxi inferior, arilo o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo, preferentemente R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, fluoro, metoxi, etoxi, fenilo, dimetilaminosulfonilo, 3-clorofenil-aminosulfonilo, carboxi, metoxi, aminosulfonilo, metilaminosulfonilo, fenilaminosulfonilo, piridin-3-il-aminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, isopropilamino-sulfonilo, más preferentemente hidrógeno, fluoro, o bromo;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo preferentemente arilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo formado por alquilo inferior, halo, o alcoxi inferior, y heteroarilo, preferentemente heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo formado por alquilo inferior, halo, o alcoxi inferior, preferentemente hidrógeno, metoxi, carboxi, fenilo, piridin-3-ilo, 3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-isopropilfenilo, 4-n-butilfenilo, 3-isopropilfenilo, más preferentemente hidrógeno o fenilo; y

R^4 es hidrógeno.

62
65

(18) Otro grupo más preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde:

R^1 es hidrógeno, alquilo, $-C(O)NR^8R^9$, cicloalquilo o arilo insustituido, preferentemente hidrógeno, 3,4-dimetoxi-fenil-aminocarbonilo, 4-metoxi-3-clorofenilaminocarbonilo, aún más preferentemente hidrógeno o metilo, particularly hidrógeno;

R^2 es ciano, hidrógeno, halo, alcoxi inferior, arilo o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo, preferentemente R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, fluoro, metoxi, etoxi, fenilo, dimetilaminosulfonilo, 3-clorofenil-aminosulfonilo, carboxi, metoxi, aminosulfonilo, metilaminosulfonilo, fenilaminosulfonilo, piridin-3-il-aminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, isopropilamino-sulfonilo, más preferentemente hidrógeno, fluoro, o bromo;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo preferentemente arilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo formado por alquilo inferior, halo, o alcoxi inferior, y heteroarilo, preferentemente heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo formado por alquilo inferior, halo, o alcoxi inferior; preferentemente hidrógeno, metoxi, carboxi, fenilo, piridin-3-ilo, 3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-isopropilfenilo, 4-n-butilfenilo, 3-isopropilfenilo, más preferentemente hidrógeno o fenilo; y

R^4 es hidrógeno.

Dentro del grupo preferido precedente (18) un grupo más preferido de compuestos es donde:

R^5 es $-COR^{10}$ donde R^{10} tiene los valores definidos en el Resumen de la Invención, preferentemente $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ o $-NR^{13}R^{14}$ según se define en el

Resumen de la Invención.

R⁶ se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo, preferentemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, o n-butilo, más preferentemente hidrógeno o metilo; y

R⁷ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y -C(O)R¹⁷ donde R¹⁷ es hidroxí, alquilo o arilo, más preferentemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, n-, iso o tert-butilo, fenilo, benzoilo, acetilo o carboxi, aún más preferentemente metilo, hidrógeno o fenilo.

En el grupo preferido anterior (18) otro grupo más preferido de compuestos es aquél donde:

R⁸ es -COR¹⁰ donde R¹⁰ tiene los valores definidos en el Resumen de la Invención, preferentemente -NR¹¹(CH₂)_nR¹² o -NR¹³R¹⁴ según se define en el Resumen de la Invención.

R⁵ se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo, preferentemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, o n-butilo, más preferentemente hidrógeno o metilo; y

R⁷ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y -C(O)R¹⁷ donde R¹⁷ es hidroxí, alquilo o arilo, más preferentemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, n-, iso o tert-butilo, fenilo, benzoilo, acetilo o carboxi, aún más preferentemente metilo, hidrógeno o fenilo.

(19) Otro grupo más preferido de compuestos de fórmula (I) es aquél donde:

R¹ y R⁴ son hidrógeno;

R² se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alcoxi inferior, -C(O)R¹⁵ y -S(O)₂NR¹³R¹⁴;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alcoxi inferior, $-C(O)R^{16}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, arilo y heteroarilo;

R^5 es $-C(O)R^{16}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior; y

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior y $-C(O)R^{17}$.

Otra realización actualmente preferida de esta invención es que, en un compuesto que tiene la estructura descrita en (15):

R^{10} se selecciona del grupo formado por hidroxí, alcoxi inferior y $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, donde

n es 2 o 3;

R^{11} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior; y,

R^{12} se selecciona del grupo formado por arilo y $-NR^{13}R^{14}$.

Otra realización actualmente preferida de esta invención es que, en un compuesto que tiene la estructura descrita en los párrafos anteriores, R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior, y, en combinación, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(20) Otra realización actualmente preferida de esta invención es un compuesto en el cual:

R^1 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior, $-(CH_2)_nR^{18}$ y $-C(O)NR^5R^6$;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, arilo y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior, alcoxi

68

inferior, arilo, heteroarilo y $-C(O)R^{16}$;

R^4 es hidrógeno;

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior;

R^6 es $-C(O)R^{10}$;

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior y arilo;

R^{18} se selecciona del grupo formado por hidroxí y $-C(O)R^{15}$; y,

r es 2 o 3.

Una realización actualmente preferida de esta invención es un compuesto que tiene como estructura la descrita en el párrafo anterior donde R^3 es arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados del grupo formado por alquilo inferior, alcoxi inferior y halo.

(21) En forma similar, otra realización actualmente preferida de esta invención es que, en un compuesto en el cual:

R^1 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior, $-(CH_2)_rR^{18}$ y $-C(O)NR^5R^6$;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, arilo y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, arilo, heteroarilo y $-C(O)R^{16}$;

R^4 es hidrógeno;

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior;

R^6 es $-C(O)R^{10}$;

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior y arilo;

R^{18} se selecciona del grupo formado por hidroxí y $-C(O)R^{15}$; y,

r es 2 o 3,

62
69

R^{10} se selecciona del grupo formado por hidroxí, alcoxi inferior, $-NR^{13}R^{14}$ y $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, donde n es 1, 2 o 3, R^{11} es hidrógeno y R^{12} se selecciona del grupo formado por hidroxí, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$, heteroarilo y $-NR^{13}R^{14}$.

(22) Otra realización actualmente preferida de esta invención es un compuesto que tiene la estructura descrita en el párrafo anterior donde R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior, heteroarilo y, en combinación, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$, o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(23) Otra realización actualmente preferida de esta invención es un compuesto en el cual:

R^1 es $-C(O)NR^8R^9$, donde R^8 es hidrógeno y R^9 es arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados del grupo formado por halo, hidroxí y alcoxi inferior;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, arilo y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, arilo, heteroarilo y $-C(O)R^{15}$;

R^4 es hidrógeno;

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior;

R^6 es $-C(O)R^{10}$;

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior y arilo;

R^{16} se selecciona del grupo formado por hidroxí y $-C(O)R^{15}$; y,

r es 2 o 3,

(24) Otra realización actualmente preferida adicional de esta invención es un compuesto en el cual:



R^1 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior;
 R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alcoxi inferior, arilo, $-C(O)R^{16}$ y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;
 R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, arilo, heteroarilo y $-C(O)R^{16}$;
 R^4 es hidrógeno;
 R^5 es $-C(O)R^{16}$; y,
 R^6 y R^7 se combinan para formar un grupo $-(CH_2)_4-$.

En un compuesto que tiene la estructura descrita en el párrafo inmediatamente anterior, otra realización actualmente preferida es que R^{10} se selecciona del grupo formado por hidroxí, alcoxi, $-NR^{13}R^{14}$ y $-NH(CH_2)_nNR^{13}R^{14}$ donde n es 2 o 3.

Otra realización actualmente preferida de esta invención es que, en un compuesto que tiene la estructura descrita en los dos párrafos anteriores, R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo inferior, y, en combinación, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

Utilidad

Las PKs cuya actividad catalítica es modulada por los compuestos de esta invención incluyen a proteínas tirosinquinasa, de las cuales existen dos tipos, receptor de tirosinquinasa (RTKs) y tirosinquinasa celulares (CTKs), y serina-tirosinquinasa (STKs). El RTK que media la transducción de señales es iniciado por una interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando), seguido por la dimerización del receptor, la estimulación transitoria de la actividad intrínseca de la proteína tirosinquinasa y fosforilación. Los sitios de unión se han

creado para las moléculas de transducción de señales intracelulares y conducen a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señalización citoplasmática que facilitan la respuesta celular apropiada (por ejemplo, división celular, efectos metabólicos sobre el microambiente extracelular, etc.). Ver, Schlessinger y Ullrich, 1992, Neuron 9:303-391.

Se ha demostrado que los sitios de fosforilación de tirosina en los receptores de los factores de crecimiento funcionan como sitios de alta afinidad de unión para los dominios SH2 (homología src) de las moléculas de señal. Fantl *et al.*, 1992, Cell 69:413-423, Songyang *et al.*, 1994, Mol. Cell. Biol. 14:2777-2785), Songyang *et al.*, 1993, Cell 72:767-778, y Koch *et al.*, 1991, Science 252:666-678. Se han identificado algunas proteínas sustrato intracelular que se asocian con los RTKs. Ellas pueden ser divididas en dos grupos principales: (1) sustratos que tienen un dominio catalítico y (2) sustratos que perdieron a tal dominio pero que pueden servir como adaptadores y asociarse con moléculas catalíticamente activas. Songyang *et al.*, 1993, Cell 72:767-778. La especificidad de las interacciones entre los receptores y los dominios SH2 de estos sustratos está determinada por los residuos de aminoácidos que circundan inmediatamente al residuo de tirosina fosforilado. Las diferencias en la afinidad de la unión entre los dominios SH2 y la secuencia de aminoácidos que rodea a los residuos fosfotirosina sobre receptores en particular son consistentes con las diferencias observadas en los perfiles de fosforilación de los sustratos. Songyang *et al.*, 1993, Cell 72:767-778. Estas observaciones sugieren que la función de cada RTK está determinada no sólo por su patrón de expresión y disponibilidad del ligando sino también por la disposición río abajo de la ruta de transducción de señales que son activados por un receptor particular. Así, la fosforilación provee una

importante etapa regulatoria que determina la selectividad de la ruta de señales reclutada por receptores específicos de factores de crecimiento, y también de receptores de factores de diferenciación.

Los STKs, siendo primariamente citosólicos, afectan la bioquímica interna de la célula, frecuentemente como una respuesta bajo línea a un evento PTK. Los STKs han sido implicados en el proceso de señales que inicia la síntesis de ADN y subsecuentemente la mitosis que conduce a la proliferación celular.

Así, la señal de transducción PK resulta en, entre otras respuestas, la proliferación celular, diferenciación, crecimiento y metabolismo. Una proliferación anormal puede ser el resultado de una variedad de trastornos y enfermedades, que incluyen el desarrollo de neoplasias tales como carcinoma, sarcoma, glioblastoma y hemangioma, trastornos tales como leucemia, psoriasis, arteriosclerosis, artritis y retinopatía diabética y otros trastornos relacionados con la angiogénesis descontrolada y/o vasculogénesis.

No se requiere en función de la práctica de la presente invención una comprensión precisa del mecanismo mediante el cual los compuestos de esta invención inhiben PKs. Sin embargo, mientras que por este medio no sea unida a un mecanismo particular o teoría, se cree que los compuestos interactúan con aminoácidos de la región catalítica de los PKs. Los PKs típicamente poseen una estructura bi lobulada en donde el ATP parece estar unido en la hendidura entre los dos lóbulos en una región donde los aminoácidos, entre las PKs, están conservados. Se cree que los inhibidores de las PKs se unen por interacciones no covalentes tales como uniones hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas en la misma región general donde el antedicho ATP se une a las PKs. Más específicamente, se piensa que el componente 2-indolinona de

los compuestos de esta invención se une en el espacio general normalmente ocupado por el anillo adenina del ATP. La especificidad de una molécula particular para un particular PK puede luego surgir como el resultado de interacciones adicionales entre varios substituyentes sobre el núcleo de la 2-indolinona y el domino específico de aminoácidos de un PKs particular. De esta forma los diferentes substituyentes de la indolinona pueden contribuir para una unión preferencial a un PKs particular. La capacidad para seleccionar compuestos activos sobre diferentes sitios de unión a ATP (u otros nucleótidos) hace que los compuestos de esta invención sean útiles para ubicar cualquier proteína con tales sitios. Los compuestos divulgados aquí son útiles en ensayos *in vitro* para tales proteínas, y también muestran efectos terapéuticos *in vivo* a través de la interacción con tales proteínas.

Adicionalmente, los compuestos de la presente invención proveen una aproximación en el tratamiento de muchas clases de tumores sólidos, que incluyen pero no están limitados a carcinomas, sarcomas que incluyen al sarcoma de Kaposi, eritroblastoma, glioblastoma, meningioma, astrocitoma, melanoma y mioblastoma. También se contempla en esta invención el tratamiento o prevención de tumores cancerosos no sólidos tales como leucemia. Las indicaciones pueden incluir, pero no están limitadas a, cánceres de cerebro, cánceres de vejiga, cánceres de ovario, cánceres gástricos, cánceres de páncreas, cánceres de colon, cánceres de la sangre, cánceres de pulmón y cánceres de huesos.

Ejemplos ulteriores, sin limitación, de los tipos de trastornos relacionados con una actividad inapropiada de PK y que los compuestos descritos aquí pueden ser útiles en la prevención, tratamiento y estudio, son los trastornos en la

proliferación celular, trastornos fibróticos y trastornos metabólicos.

Los trastornos en la proliferación celular que pueden ser prevenidos, tratados y además estudiados por la presente invención incluye cáncer, trastornos proliferativos de los vasos sanguíneos y trastornos proliferativos de las células mesangiales.

Los trastornos proliferativos de los vasos sanguíneos se refieren a trastornos relacionados con una vasculogénesis (formación de vasos sanguíneos) y angiogénesis anormal (expansión de los vasos sanguíneos). La vasculogénesis y angiogénesis juegan un importante rol en una variedad de procesos fisiológicos normales tales como el desarrollo embrionario, la formación del cuerpo lúteo, regeneración de órganos y cicatrización de heridas, ellos también cumplen un rol pivotante en el desarrollo del cáncer donde dan por resultado la formación de nuevos capilares que son necesarios para mantener vivo al tumor. Otros ejemplos de trastornos en la proliferación de los vasos sanguíneos incluyen artritis, donde los nuevos vasos sanguíneos capilares invaden las articulaciones y destruyen el cartílago, y enfermedades oculares, similares a la retinopatía diabética, donde los nuevos capilares en la retina invaden al vítreo, sangran y causan ceguera.

Se han identificado dos estructuras relacionadas con las RTKs que unen a VEGF con alta afinidad: el receptor simil-fms tirosina 1 (flt-1) (Shibuya *et al.*, 1990, Oncogene, 5:519-524; De Vries *et al.*, 1992, Science, 255:989-991) y el receptor KDR/FLK-1, también conocido como VEGF-R2. Se ha publicado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mitógeno específico de células endoteliales con una actividad que promueve el crecimiento de las células endoteliales *in vitro*. Ferrara & Henzel, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm..

161:851-858; Vaisman *et al.*, 1990, J. Biol. Chem., 265:19461-19566. La información divulgada en la solicitud U.S. Ser. Nos. 08/193,629, 08/038,596 y 07/975,750, sugiere fuertemente que el VEGF no es solamente responsable de la proliferación de las células endoteliales sino también el es el primer regulador de la angiogénesis normal y patológica. Ver en forma general, Klagsburn & Soker, 1993, Current Biology, 3(10):699-702; Houck, *et al.*, 1992, J. Biol. Chem., 267:26031-26037.

La vasculogénesis y angiogénesis normal juega un importante rol en una variedad de procesos fisiológicos tales como el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas, regeneración de órganos y procesos reproductivos femeninos tales como el desarrollo del folículo en el cuerpo lúteo durante la ovulación y el crecimiento de la placenta después de la preñez. Folkman & Shing, 1992, J. Biological Chem., 267(16):10931-34. La vasculogénesis y/o angiogénesis descontrolada ha sido asociada con enfermedades tales como la diabetes y también con tumores sólidos malignos que dependen de la vascularización para crecer. Klagsburn & Soker, 1993, Current Biology, 3(10):699-702; Folkham, 1991, J. Natl. Cancer Inst., 82:4-6; Weidner, *et al.*, 1991, New Engl. J. Med., 324:1-5.

El supuesto rol del VEGF en la proliferación de las células endoteliales y en la migración durante la angiogénesis y vasculogénesis indican un rol importante, en este proceso, para el receptor KDR/FLK-1. Las enfermedades tales como la diabetes mellitus (Folkman, 198, in Xlth Congress of Thrombosis y Haemostasis (Verstraeta, *et al.*, eds.), pp. 583-596, Leuven University Press, Leuven) y la artritis, y también el crecimiento de tumores malignos puede ser el resultado de una angiogénesis descontrolada. Ver, por ejemplo, Folkman, 1971, N. Engl. J. Med., 285:1182-1186. Los receptores a los cuales el VEGF se une

específicamente son un poderoso e importante blanco terapéutico para la regulación y modulación de la vasculogénesis y/o angiogénesis y para una variedad de enfermedades severas que involucran crecimiento celular anormal causado por tales procesos. Plowman, *et al.*, 1994, DN&P, 7(6):334-339. Más particularmente, los receptores KDR/FLK-1 altamente específicos tiene un rol en la neovascularización haciéndolos un blanco de elección para aproximaciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades que involucran la formación descontrolada de vasos sanguíneos.

De esta manera, la presente invención provee compuestos capaces de regular y/o modular las señales de transducción de la tirosinquinasa que incluye al receptor de transducción de señales KDR/FLK-1 en función de inhibir o promover la angiogénesis y/o vasculogénesis, estos son, compuestos que inhiben, previenen o interfieren con las señales transducidas por KDR/FLK-1 cuando es activado por ligandos tales como VEGF. Aunque se cree que los compuestos de la presente invención actúan sobre un receptor u otro componente a lo largo de la ruta de transducción de señales tirosinquinasa, ellos pueden también actuar directamente sobre las células tumorales que resultan de una angiogénesis descontrolada.

Aunque la nomenclatura de las contrapartes murinas y humanas del receptor genérico "flk-1" difieren, ellos son, en muchos aspectos, intercambiables. El receptor murino, Flk-1, y su contraparte humana, KDR, comparte una homología de secuencia del 93.4% entre los dominios intracelulares. Así mismo, el FLK-1 murino se une al VEGF humano con la misma afinidad que al VEGF de ratón, y en consecuencia, es activado por el ligando derivado de una u otra especie. Millauer *et al.*, 1993, Cell, 72:835-846; Quinn *et al.*, 1993, Proc. Natl.

XS
27

Acad. Sci. USA, 90:7533-7537. El FLK-1 también está asociado con y subsecuentemente sustrato RTK humano fosforilado en tirosina (por ejemplo, PLC- γ o p85) cuando se co-expresan in células 293 (fibroblastos de riñón embrionario humano).

Por ende, los modelos que dependen del receptor FLK-1 son aplicables directamente para comprender al receptor KDR. Por ejemplo, es aplicable directamente el uso del receptor FLK-1 murino en métodos que identifican compuestos que regulan las rutas de transducción de señales murinas para la identificación de compuestos que pueden ser usados para regular las rutas de transducción de señales humanas, esto es, las que regulan la actividad relacionada con el receptor KDR. De esta manera, los compuestos químicos identificados como inhibidores de KDR/FLK-1 *in vitro*, pueden ser confirmados en adecuados modelos *in vivo*. Ambos modelos animales de ratón y rata *in vivo* han demostrado ser de un excelente valor para el examen del potencial clínico de los agentes que actúan sobre la inducción de la ruta KDR/FLK-1 de transducción de señales.

De este modo, la presente invención provee compuestos que regulan, modulan y/o inhiben la vasculogénesis y/o angiogénesis afectando la actividad enzimática del receptor KDR/FLK-1 e interfiriendo con las señales transducidas por KDR/FLK-1. Así, la presente invención provee un acercamiento terapéutico para el tratamiento de muchas clases de tumores sólidos que incluyen, pero no están limitados a, glioblastoma, melanoma y sarcoma de Kaposi, y ovario, pulmón, mama, próstata, páncreas, colon y carcinoma epidermoide. En adición, los datos sugieren que la administración de compuestos que inhiben las rutas de transducción de señales mediadas por KDR/Flk-1 pueden ser también utilizados

en el tratamiento de hemangioma, restenoides y retinopatías diabéticas.

Es más, esta invención se relaciona con la inhibición de la vasculogénesis y angiogénesis de otras rutas mediadas por receptor, que incluyen las rutas que comprenden al receptor *flt-1*.

La transducción de señales mediada por el receptor tirosinquinasa es iniciada por una interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando), seguido de la dimerización del receptor, estimulación transitoria de la actividad intrínseca de la proteína tirosinquinasa y autofosforilación. Los sitios de unión están creados para moléculas de transducción de señales intracelulares que conduzcan a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señal intracitoplasmáticas que facilitan la respuesta celular apropiada, por ejemplo, división celular, y efectos metabólicos del microambiente extracelular. Ver, Schlessinger y Ullrich, 1992, Neuron, 9:1-20.

La cercana homología de las regiones intracelulares de KDR/FLK-1 con las del receptor PDGF- β (homología del 50.3%) y/o con el receptor *flt-1* relacionado indican la inducción de rutas de transducción de señales superpuestas. Por ejemplo, se ha demostrado la unión de regiones que involucran diferentes sitios de autofosforilación en el receptor PDGF- β , miembros de la familia de *src* (Twamley *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7696-7700), fosfatidilinositol-3'-quinasa (Hu *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol., 12:981-990), fosfolipasa γ (Kashishian & Cooper, 1993, Mol. Cell. Biol., 4:49-51), proteína que activa a ras-GTPasa, (Kashishian *et al.*, 1992, EMBO J., 11:1373-1382), PTP-ID/syp (Kazlauskas *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10 90:6939-6943), Grb2 (Arvidsson *et al.*, 1994, Mol. Cell. Biol., 14:6715-6726), y las moléculas adaptadoras Shc y Nck (Nishimura *et al.*, 1993, Mol. Cell. Biol., 13:6869-6896).

Ver generalidades, Claesson-Welsh, 1994, Prog. Growth Factor Res., 5:37-54. De esta manera, es probable que las rutas de transducción de señales activadas por KDR/FLK-1 incluyan a las rutas de ras (Rozakis *et al.*, 1992, Nature, 360:689-692), la PI-3'-quinasa, las rutas mediadas por src y las rutas mediadas por p1cy. Cada una de estas rutas puede jugar un rol crítico en el efecto angiogénico y/o vasculogénico de KDR/FLK-1 en las células endoteliales. Consecuentemente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de los compuestos orgánicos descritos aquí para modular la angiogénesis y vasculogénesis cuando tales procesos están controlados por estas rutas.

A la inversa, también están implicados y pueden ser tratados o prevenidos por los métodos de esta invención los trastornos relacionados con el encogimiento, contracción o cerrado de los vasos sanguíneos, tal como la restenosis.

Los trastornos fibróticos referidos a la formación anormal de matrices extracelulares. Ejemplos de trastornos fibróticos incluyen cirrosis hepática y trastornos proliferativos de células mesangiales. La cirrosis hepática está caracterizada por un incremento en los constituyentes de la matriz extracelular que resulta en la formación de una cicatriz hepática. Un incremento en la matriz extracelular que resulta en una cicatriz hepática también puede ser causado por una infección viral tal como la hepatitis. Parece que los lipocitos juegan un mayor rol en la cirrosis hepática. Otros trastornos fibróticos implicados incluyen a la aterosclerosis.

Los trastornos proliferativos de las células mesangiales se refieren a trastornos causados por una proliferación anormal de células mesangiales. Los trastornos proliferativos mesangiales incluyen a varias enfermedades renales

humanas tales como glomerulonefritis, nefropatía diabética y nefrosclerosis maligna, y también trastornos tales como síndrome de microangiopatía trombótica, rechazo del trasplante, y glomerulopatías. Se ha implicado al RTK PDGFR en el mantenimiento de la proliferación de las células mesangiales. Floege *et al.*, 1993, Kidney International 43:47S-54S.

Muchos de los cánceres son trastornos de la proliferación celular, tal como se mostró anteriormente, las PKs han sido asociadas con trastornos proliferativos de las células. Por esto, no sorprende que las PKs tales como, por ejemplo, los miembros de la familia RTK hayan sido asociados al desarrollo del cáncer. Algunos de estos receptores, símil EGFR (Tuzi *et al.*, 1991, Br. J. Cancer 63:227-233, Torp *et al.*, 1992, APMIS 100:713-719) HER2/neu (Slamon *et al.*, 1989, Science 244:707-712) y PDGF-R (Kumabe *et al.*, 1992, Oncogene, 7:627-633) están sobre expresados en muchos tumores y/o persistentemente activados por un circuito autócrino. En realidad, ha sido demostrada esta sobre expresión de los receptores en la mayoría de los cánceres comunes y severos (Akbasak y Suner-Akbasak *et al.*, 1992, J. Neurol. Sci., 111:119-133, Dickson *et al.*, 1992, Cancer Treatment Res. 61:249-273, Korc *et al.*, 1992, J. Clin. Invest. 90:1352-1360) y en los circuitos autócrinos (Lee y Donoghue, 1992, J. Cell. Biol., 118:1057-1070, Korc *et al.*, supra, Akbasak y Suner-Akbasak *et al.*, supra). Por ejemplo, el EGFR se lo ha asociado con carcinoma de células escamosas, astrocitoma, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga. El HER2 ha sido asociado con cáncer de mama, ovario, gástrico, pulmón, páncreas y vejiga. El PDGFR ha sido asociado al glioblastoma y melanoma, y también al cáncer de pulmón, ovario y próstata. El RTK c-met ha sido también asociado con la formación de tumores malignos. Por ejemplo, el c-

met ha sido asociado con, entre otros cánceres, carcinomas colorectales, tiroides, pancreático, gástrico y hepatocelular y linfomas. Adicionalmente el c-met se lo ha ligado a la leucemia. También se ha detectado sobre expresión del gen c-met en pacientes con la enfermedad de Hodgkins y la enfermedad de Burkitts.

Además, al IGF-IR se lo ha implicado en el soporte nutricional y en la diabetes de tipo-II, también ha sido asociado con varios tipos de cánceres. Por ejemplo, al IGF-I se lo ha implicado como un estimulador del crecimiento autócrino para ciertos tipos de tumores, por ejemplo, células de carcinoma de cáncer de mama humano (Arteaga *et al.*, 1989, J. Clin. Invest. 84:1418-1423) y tumores de pulmón de células pequeñas (Macauley *et al.*, 1990, Cancer Res. 50:2511-2517). Además, el IGF-I, está íntegramente involucrado en la diferenciación y crecimiento normal del sistema nervioso, también parece ser un estimulador autócrino de los gliomas humanos. Sandberg-Nordqvist *et al.*, 1993, Cancer Res. 53:2475-2478. La importancia de IGF-IR y sus ligandos en la proliferación celular está además sostenida por el hecho que muchos tipos celulares en cultivo (fibroblastos, células epiteliales, células del músculo liso, linfocitos T, células mieloides, condrocitos y osteoblastos (las células troncales de la médula ósea)) son estimuladas a crecer por IGF-I. Goldring y Goldring, 1991, Eukaryotic Gene Expression, 1:301-326. Baserga y Coppola sugieren que el IGF-IR cumple un rol central en el mecanismo de transformación y, como tal, podría ser un blanco preferencial para intervenciones terapéuticas para un amplio espectro de malignidades humanas. Baserga, 1995, Cancer Res. 55:249-252, Baserga, 1994, Cell 79:927-930, Coppola *et al.*, 1994, Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595.

A los STKs se los ha implicado en muchos tipos de cánceres que incluyen,

notablemente, cáncer de mama (Cance, *et al.*, Int. J. Cancer, 54:571-77 (1993)).

La asociación entre la actividad anormal de PK y la enfermedad no se restringe 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, restenosis, enfermedad de von Hippel-Lindau, hiperproliferación epidérmica, enfermedades neurodegenerativas, degeneración macular relacionada a la edad y hemangiomas. Por ejemplo, al EGFR se lo ha indicado en la cicatrización de heridas dérmicas y de la córnea. Se indicaron defectos en Insulina-R y IGF-1R en diabetes mellitus tipo-II. Una correlación más completa entre RTKs específicos y sus indicaciones terapéuticas están divulgados en Plowman *et al.*, 1994, DN&P 7:334-339.

Como se mostró previamente, no solamente los RTKs sino también los CTKs que incluyen, pero no están limitados a, src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr y yrk (revisión de Bolen *et al.*, 1992, FASEB J., 6:3403-3409) están involucrados en las rutas de transducción de señales metabólicas y proliferativas, y tal como se podría esperar, y como se ha demostrado, están involucrados en muchos trastornos mediados por PTK a los cuales la presente invención está dirigida. Por ejemplo, se ha demostrado que el src mutado (v-src) es una oncoproteína (pp60^{v-src}) en el pollo. Más aun, su homólogo celular, el proto-oncogen pp60^{c-src} transmite señales oncogénicas de muchos receptores. La sobreexpresión de EGFR o HER2/neu en los tumores conduce a la activación constitutiva de pp60^{c-src}, que es característica de las células malignas pero que está ausente en las células normales. Por otra parte, los ratones deficientes en la expresión de c-src muestran un fenotipo osteopetrótico, indicando una



participación clave del c-src en la función osteoclástica y una posible participación en los trastornos relacionados.

De manera similar, al Zap70 se lo ha implicado en la señalización de las células T que puede relacionarse a los trastornos autoinmunes.

Se ha asociado a los STKs con trastornos inflamatorios, enfermedad autoinmune, inmunorespuestas, y trastornos de hiperproliferación tales como restenosis, fibrosis, psoriasis, osteoartritis y artritis reumatoidea.

También los PKs han sido implicados en implantes embrionarios. De este modo, los compuestos de esta invención pueden proveer un método efectivo para prevenir tales implantes embrionarios y de allí ser útiles como agentes de control de la natalidad. Además, los trastornos que pueden ser tratados o prevenidos utilizando los compuestos de esta invención son los trastornos inmunológicos tales como enfermedades autoinmunes, AIDS y trastornos cardiovasculares tales como aterosclerosis.

Finalmente, se sospecha actualmente que ambos, los RTKs y los CTKs, están involucrados en los trastornos hiperinmunes.

Se muestra en la Tabla 2 de más abajo ejemplos del efecto de una cantidad de compuestos de esta invención sobre varios PTKs. Los compuestos y los datos presentados no han sido elaborados como limitantes del alcance de esta invención en cualquiera de las maneras que estos sean.

I. Administración y composición farmacéutica

Se puede administrar un compuesto de la presente invención o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo como tal a un paciente humano o se lo puede administrar en composiciones farmacéuticas en las que los materiales precedentes están mezclados con vehículos o excipientes adecuados. Las

técnicas para la formulación y administración de drogas se pueden encontrar en "Remington's Pharmacological Sciences" (Ciencias Farmacológicas de Remington), Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Según se los utiliza en el presente, los términos "administrar" o "administración" se refieren a la administración de un compuesto de la Fórmula (I) o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo o de una composición farmacéutica que contenga un compuesto de la Fórmula (I) o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo a un organismo con el objeto de prevenir o tratar un desorden relacionado con PK.

Las vías de administración adecuadas puede incluir, sin limitación, la administración oral, rectal, transmucosa o intestinal o inyección intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intravítrea, intraperitoneal, intranasal o. Las vías de administración preferidas son la oral y la parenteral.

Alternativamente, se puede administrar el compuesto de manera local en vez de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección del compuesto directamente en un tumor sólido, a menudo en una formulación de depósito o de liberación lenta.

Además, se puede administrar la droga en un sistema de administración de droga con objetivo, por ejemplo, en un liposoma revestido con un anticuerpo específico para el tumor. Los liposomas tendrán como objetivo el tumor y serán tomados por éste en forma selectiva.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar utilizando procesos bien conocidos en la técnica, por medio del procesos de mezclado, disolución, granulación, elaboración de grageas, pulverización,

emulsionado, encapsulado, entrampado o liofilización convencionales.

Las composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden emplear farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para la vía inyectable, los compuestos de la presente invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en soluciones tampón compatibles fisiológicamente tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer, o una solución tampón salina fisiológica. Para la administración transmucosa, en la formulación se emplean sustancias penetrantes apropiadas para la barrera a traspasar. Estas sustancias penetrantes son generalmente conocidas en la técnica.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Estos vehículos permiten que los compuestos de la invención se puedan formular en forma de tabletas, píldoras, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pasta aguada, suspensiones y similares, para la ingestión oral por parte del paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden hacer empleando un excipiente sólido, optativamente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar otros auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de tabletas o grageas. Los excipientes útiles, en particular, son los rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa, tales

como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de papa y otros materiales tales como gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetil celulosa sódica y/o polivinil pirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinil pirrolidona de enlace cruzado, agar o ácido algínico. También se puede usar una sal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se proveen con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden emplear soluciones de azúcar concentradas que contengan, optativamente, goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes orgánicos adecuados. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los revestimientos de tabletas o grageas para su identificación o para caracterizar combinaciones diferentes de dosis del compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de cierre a presión hechas de gelatina así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante como, por ejemplo, glicerol o sorbitol. Las cápsulas pueden contener los ingredientes activos mezclados con un relleno como, por ejemplo, lactosa, un aglutinante como, por ejemplo, almidón y/o un lubricante como, por ejemplo, talco o estearato de magnesio y, optativamente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados como, por ejemplo, aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. En estas formulaciones también se pueden agregar estabilizadores.

Las composiciones farmacéuticas que también se pueden usar incluyen cápsulas de gelatina rígida. Como ejemplo no limitante, la cápsula del compuesto

85
87

activo para vía oral que contiene la formulación del producto droga puede presentarse en potencias de dosis de 50 y 200 mg (códigos de formulación J-011248-AA-00 y J-011248-AA-01, respectivamente). Estas dos potencias de dosis se hacen con los mismos gránulos llenado con ellos cápsulas de gelatina rígida de diferentes tamaños, tamaño 3 para las cápsulas de 50 mg y tamaño 0 para las cápsulas de 200 mg. La composición de la formulación puede ser, por ejemplo, la que se indica en la Tabla 3.

A. TABLA 3

Nombre / grado del ingrediente	Concentración en granulación (% en peso)	Cantidad en cápsula de 50 mg (mg)	Cantidad en cápsula de 200 mg (mg)
Código de formulación	J-011248-AA	J-011248AA-00	J-011248-AA-01
Compuesto activo NF	65,0	50,0	200,0
Manitol NF	23,5	18,1	72,4
Croscarmelosa de sodio NF	6,0	4,6	18,4
Povidona K 30 NF	5,0	3,8	15,2
Estearato de magnesio NF	0,5	0,36	1.52
Cápsula, amarillo sueco NF		Tamaño 3	Tamaño 0

Las cápsulas se pueden envasar en frascos de vidrio o plástico marrón para proteger al compuesto activo de la luz. Los envases que contengan la formulación de la cápsula del compuesto activo se deben almacenar a temperatura ambiente controlada (15 - 30° C).

Para la administración por inhalación, los compuestos para usar de acuerdo con la presente invención se administran bien en forma de aerosol, rocío utilizando un envase presurizado o un nebulizador y un propulsor adecuado, por ejemplo, sin limitación, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede controlar proveyendo una válvula para que libere una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de gelatina, por ejemplo, para usar en un inhalador o insuflador se pueden formular de modo que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, como lactosa o almidón.

Los compuestos también se pueden formular para su administración por vía parenteral, por ejemplo, por inyección de bolo $\llll$ o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases con varias dosis, con el agregado de un conservante. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosas, y pueden contener materiales para formulaciones tales como agentes suspensores, estabilizadores y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de una forma soluble en agua como, por ejemplo, sin limitación, una sal del compuesto activo. Además, se pueden preparar

suspensiones de los compuestos activos en un vehículo lipófilo. Los vehículos lipófilos adecuados incluyen a los aceites grasos tales como el aceite de sésamo, los ésteres de ácido graso sintético tales como etil oleato y triglicéridos, o materiales tales como liposomas. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión, como la carboximetil celulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Optativamente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados y/o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones de alta concentración.

Alternativamente, el ingrediente activo también puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, a agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones para uso rectal, tales como supositorios o enemas retentivas, utilizando, por ejemplo, bases para supositorios convencionales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular en preparaciones de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, en forma subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Un compuesto de esta invención se puede formular para esta vía de administración con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, en una emulsión con un aceite farmacéuticamente aceptable), con resinas de intercambio iónico, o como un derivado escasamente soluble como, por ejemplo, sin limitación, sal escasamente soluble.

Un ejemplo no limitante de un vehículo farmacéutico para los compuestos

hidrofóbicos de la invención es un sistema cosolvente que comprende alcohol benzílico, un agente tensioactivo no polar, un polímero orgánico mezclable en agua y una fase acuosa como, por ejemplo, el sistema cosolvente VPD. El VPD consisten en una solución de 3 % en peso por volumen de alcohol benzílico, 8 % en peso por volumen de agente tensioactivo no polar Polisorbato 80, y 65 & en peso pro volumen de polietilenglicol 300, completada hasta el volumen en etanol absoluto. El sistema cosolvente VPD (VPD : D5W) consiste de VPD diluido 1:1 con una solución de 5% de dextrosa en agua. Este sistema cosolvente disuelve bien los compuestos hidrofóbicos, y el mismo produce baja toxicidad luego de la administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de este sistema cosolvente se pueden variar considerablemente sin destruir sus características de solubilidad toxicidad. Además, se puede variar la identidad de los componentes del cosolvente: por ejemplo, se pueden usar otros agentes tensioactivos no polares de baja toxicidad en lugar del Polisorbato 80, se puede variar el tamaño de la fracción de polietilenglicol, otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, por ejemplo, la polivinil pirrolidona, y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir a la dextrosa.

Como alternativa, se pueden emplear otros sistemas de suministro para los compuestos farmacéuticos hidrofóbicos. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro de drogas hidrofóbicas. Además, se pueden utilizar ciertos solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido, aunque a menudo a costa de una mayor toxicidad.

Además, los compuestos se pueden suministrar utilizando un sistema de liberación sostenida, como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan el agente terapéutico. Se han establecido diversos

materiales de liberación sostenida, los que son bien conocidos para los expertos en la técnica. Según su naturaleza química, las cápsulas de liberación sostenida pueden liberar los compuestos desde durante unas pocas semanas hasta durante más de 100 días. Según la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear otras estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente también pueden comprender vehículos o excipientes de fase sólida o gel adecuados. Son ejemplos no limitativos de tales vehículos o excipientes el carbonato de calcio, el fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como los polietilenglicoles.

Muchos de los compuestos moduladores de la PK de la invención se pueden proporcionar en forma de sales fisiológicamente aceptables donde el compuesto reivindicado puede formar la especie con carga negativa o positiva. Son ejemplos no limitativos de sales en las que el compuesto forma la porción con carga positiva el amonio cuaternario (definido en otra parte de la presente), sales tales como clorhidrato, sulfato, carbonato, lactato, tartrato, malato, maleato, succinato, donde el átomo de nitrógeno del grupo amonio cuaternario es un nitrógeno del compuesto seleccionado de esta invención que ha reaccionado con el ácido apropiado. Las sales en las que un compuesto de esta invención forma la especie con carga negativa incluyen, sin limitación, las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio formadas por la reacción de un grupo ácido carboxílico en el compuesto con una base apropiada (por ejemplo, hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de calcio (Ca(OH)₂), etc.).

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en la presente

invención incluyen composiciones donde el contenido de ingredientes activos representa una cantidad suficiente para lograr el objetivo propuesto, por ejemplo, la modulación de la actividad de la PK o el tratamiento o la prevención de un desorden relacionado con la PK.

Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad del compuesto efectiva para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto bajo tratamiento.

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva se encuentra dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada que se brinda en la presente.

Para cualquier compuesto utilizado en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de los ensayos de cultivos de células. Luego, se puede formular la dosificación para usar en modelos animales de manera de lograr un rango de concentración circulante que incluye la IC_{50} determinada en el cultivo de células (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media máxima de la actividad de la PK). Luego esta información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles para seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos descritos en la presente se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, determinando la IC_{50} y la LD_{50} (ambas fueron comentadas anteriormente en la presente) respecto de un compuesto sujeto. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos de células y estudios sobre animales se pueden usar para formular un rango de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede variar

dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. la formulación, vía de administración y dosificación exactas las puede elegir cada médico individualmente teniendo en cuenta el estado del paciente (Ver, por ejemplo, Finzi y col., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics" (La base farmacológica de la terapéutica), capítulo 1, página 1).

La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma de la especie activa que sean suficientes para mantener los efectos moduladores de la quinasa. Estos niveles en plasma se denominan concentraciones efectivas mínimas (MEC). La MEC variará respecto de cada compuesto pero se la puede estimar a partir de los datos *in vitro*, por ejemplo la concentración necesaria para lograr un 50 - 90 % de inhibición de una quinasa se puede determinar utilizando los ensayos descritos en la presente. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerá de las características individuales y la vía de administración. Se pueden usar ensayos HPLC o bioensayos para determinar las concentraciones en plasma.

Los intervalos de dosificación también se pueden determinar utilizando el valor de la MEC. Los compuestos se deben administrar usando un régimen que mantenga los niveles en plasma por encima de la MEC durante el 10 - 90 % del tiempo, preferiblemente entre el 30 - 90 % del tiempo y, más preferiblemente, entre el 50 y el 90 % del tiempo.

En la actualidad, las cantidades terapéuticamente efectivas de los compuesto de la Fórmula (I) pueden oscilar entre aproximadamente 25 mg/m² y 1500 mg/m² por día; preferiblemente, aproximadamente 3 mg/m²/día. Aún más preferiblemente, 50 mg/gm qd hasta 400 mg/qd.

En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración

local efectiva de la droga puede no estar relacionada con la concentración en plasma y se pueden emplear otros procedimientos conocidos en la técnica para determinar la cantidad e intervalo de dosificación correctos.

La cantidad de una composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto bajo tratamiento, la gravedad de su afección, la forma de administración, el criterio del médico que la prescriba, etc.

Si se desea, las composiciones se pueden presentar en un paquete o dispositivo expendedor, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contengan el ingrediente activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, papel metálico o plástico, como un envase tipo "blister". El paquete o dispositivo expendedor puede venir acompañado por instrucciones para la administración. El paquete o expendedor también puede venir acompañado de una advertencia relacionada con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación el uso o venta de productos farmacéuticos, advertencia ésta que reflejará la aprobación por parte de esa agencia de la forma de las composiciones o la administración a seres humanos o uso veterinario. Esta advertencia, por ejemplo, puede ser el etiquetado aprobado por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos para las drogas de venta con receta o la inserción de una leyenda de producto aprobado. También se pueden preparar composiciones que comprenden un compuesto de la invención formuladas en un vehículo farmacéutico compatible, colocadas en un envase apropiado, y rotuladas para el tratamiento de un estado indicado. Los estados adecuados indicados en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de un tumor, la inhibición de la angiogenesis, el tratamiento de fibrosis, diabetes y similares.

También es un aspecto de la invención que un compuesto descrito en la presente, o su sal o prodroga, se podría combinar con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de las enfermedades y desórdenes comentados más arriba. Por ejemplo, se podría combinar un compuesto, sal o prodroga de esta invención con agentes alquilantes tales como el fluorouracil (5-FU) solo o combinado con luecovorina; u otros agentes alquilantes tales como, sin limitación, otros análogos de pirimidina, como el UFT, la capecitabina, la gemcitabina y la citarabina, los alquil-sulfonatos, por ejemplo, el busulfano (utilizado en el tratamiento de la leucemia granulocítica crónica) el improsulfano y el piposulfano; las aziridinas, por ejemplo, la benzodepa, la carbocuna, la meturedpa y la uredepa; etileniminas y metilmelaminas, por ejemplo, la altretamina, la trietilenmelamina, la trietilenfosforamida, la trietilentiofosforamida y la trimetilolmelamina; y las mostazas de nitrógeno, por ejemplo, el clorambucil (usado en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, la macroglobulinemia primaria y el linfoma no Hodgkin), la ciclofosfamida (empleada en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple, el neuroblastoma, el cáncer de mama, el cáncer ovárico, el cáncer de pulmón, el tumor de Wilm y el rhabdomiosarcoma), la estramustina, la isosfamida, la novembriquina, la prednimustina y la mostaza de uracilo (utilizada en el tratamiento de la trombocitosis primaria, el linfoma no de Hodgkin, la enfermedad de Hodgkin y el cáncer ovárico); y las triazinas, por ejemplo, la dacarbazina (usada en el tratamiento del sarcoma de los tejidos blandos).

Se puede usar un compuesto, sal o prodroga de esta invención en combinación con otros agentes quimioterapéuticos antimetabólicos tales como, sin limitación, los análogos del ácido fólico, por ejemplo, el metotrexato (usado en

el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, el coriocarcinoma, la micosis fungoides, el cáncer de mama, el cáncer de cabeza y cuello y el sarcoma osteogénico) y la pteropterina; y los análogos de purina tales como la mercaptopurina y la tioguanina que encuentran uso en el tratamiento de las leucemias granulocítica aguda, linfocítica aguda y granulocítica crónica.

Se contempla que un compuesto, sal o prodroga de esta invención también se puede usar en combinación con productos quimioterapéuticos basados en productos naturales tales como, sin limitación, los alcaloides de vinca, por ejemplo, la vinblastina (usada en el tratamiento del cáncer de mama y de testículos), la vincristina y la vindesina; las epipodofilotoxinas, por ejemplo, la etoposida y la teniposida, siendo las dos útiles en el tratamiento del cáncer de testículos y el sarcoma de Kaposi; los agentes quimioterapéuticos antibióticos, por ejemplo, la daunorubicina, la doxorubicina, la epirubicina, la mitomicina (usada para tratar el cáncer de estómago, del cuello del útero, de colon, de mama, de vejiga y de páncreas), la dactinomicina, la temozolomida, la plicamicina, la bleomicina (usada en el tratamiento del cáncer de piel, esófago y del tracto genitourinario); y los agentes quimioterapéuticos enzimáticos tales como la L-asparaginasa.

Además de lo antedicho, un compuesto, sal o prodroga de esta invención también se podría usar en combinación con los complejos de coordinación de platino (cisplatino, etc.); ureas sustituidas tales como hidroxidurea; derivados de metilhidrazina, por ejemplo, procarbazona; supresores adrenocorticales, por ejemplo, mitotano, aminoglutarimida, y hormonas y antagonistas hormonales tales como los adrenocorticoesteroides (por ejemplo, prednisona), progestinas (por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona); estrógenos (por ejemplo,

dietilestilbestrol), antiestrógenos tales como tamoxifeno; andrógenos, por ejemplo, propionato de testosterona; e inhibidores de la aromatasa tales como el anastrozol.

Por último, también se contempla que la combinación de un compuesto de esta invención será efectiva en combinación con mitoxantrona o paclitaxel para el tratamiento de cánceres tumorales sólidos o leucemias tales como, sin limitación, la leucemia mielogenosa aguda (no linfocítica).

PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS

Se puede emplear la siguiente metodología general de síntesis para preparar los compuestos de la presente invención:

El 2-oxindol apropiadamente sustituido (1 equiv.), el aldehído apropiadamente sustituido (1.2 equiv.) y una base (0.1 equiv.) se mezclan en un solvente (1-2 ml/mmol 2-oxindol) y la mezcla luego se calienta durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12 horas. Después de enfriar, el precipitado que se forma se filtra, se lava con etanol o éter frío y se seca al vacío para dar el producto sólido. Si no se forma un precipitado, la mezcla de reacción se concentra y el residuo se tritura con diclorometano/éter, el sólido resultante se recolecta por filtración y luego se seca. El producto opcionalmente se puede seguir purificando por cromatografía.

La base puede ser una base orgánica o inorgánica. Si se utiliza una base orgánica, preferentemente es una base nitrogenada. Entre los ejemplos de bases orgánicas nitrogenadas se incluyen, sin limitación, diisopropilamina, trimetilamina, trietilamina, anilina, piridina, 1,8-diazabicyclo[5.4.1]undec-7-eno, pirrolidina y piperidina.

Entre los ejemplos de bases inorgánicas se pueden mencionar, por

ejemplo, amoníaco, hidróxidos de metal alcalino o alcalino-térreo, fosfatos, carbonatos, bisulfatos y amidas. Los metales alcalinos incluyen, litio, sodio y potasio mientras que las tierras alcalinas incluyen calcio, magnesio y bario.

En una realización actualmente preferida de esta invención, cuando el solvente es un solvente prótico, tal como agua o alcohol, la base es una base inorgánica de metal alcalino o alcalino térreo, preferentemente, un hidróxido de metal alcalino o alcalino-térreo.

Será evidente para los conocedores de la materia, en base a los principios generales de las síntesis orgánicas conocidos así como en base a la presente descripción, cuál base sería la más apropiada para la reacción que se contemple.

El solvente en el cual se realiza la reacción puede ser un solvente prótico o aprótico, preferentemente es un solvente prótico. Un "solvente prótico" es un solvente que tiene un o más átomo(s) de hidrógeno átomo(s) unido en forma covalente a átomos de oxígeno o nitrógeno que hace que los átomos de hidrógeno sean apreciablemente ácidos y por lo tanto capaces de ser "compartidos" con un soluto a través de una unión de hidrógeno. Entre los ejemplos de solventes próticos se incluyen, sin limitación, agua y alcoholes.

Un "solvente aprótico" puede ser polar o non-polar pero, en cualquiera de los casos, no contiene hidrógenos ácidos y por lo tanto no es capaz de unirse a través de hidrógeno con los solutos. Algunos ejemplos no limitativos de solventes apróticos no polares son pentano, hexano, benceno, tolueno, cloruro de metileno y tetracloruro de carbono. Ejemplos de solventes polares apróticos son cloroformo, tetrahidro- furano, dimetilsulfóxido y dimetilformamida.

En una realización actualmente preferida de esta invención, el solvente es un solvente prótico, preferentemente agua o un alcohol tal como etanol.

La reacción se conduce a temperaturas superiores que la temperatura ambiente. La temperatura generalmente es entre aproximadamente 30° C y aproximadamente 150° C, preferentemente entre aproximadamente 80° C y aproximadamente 100° C, más preferentemente entre aproximadamente 75° C y aproximadamente 85° C, que es aproximadamente el punto de ebullición del etanol. Por "aproximadamente" se entiende que el rango de temperatura es preferentemente dentro de los 10 grados Celcius de la temperatura indicada, más preferentemente dentro de los 5 grados Celcius de la temperatura indicada y , más preferentemente, dentro de los 2 grados Celcius de la temperatura indicada. Por lo tanto, por ejemplo, por "aproximadamente 75° C" se indica 75° C $\pm$ 10° C, preferentemente 75° C $\pm$ 5° C y más preferentemente, 75° C $\pm$ 2° C.

Los 2-Oxíndoles y aldehídos se pueden sintetizar rápidamente usando técnicas bien conocidas en las artes químicas. Los conocedores de la materia apreciarán que se pueden utilizar otras vías de síntesis para formar los compuestos de la invención y que los siguientes se ofrecen en forma de ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Las siguientes preparaciones y ejemplos se presentan para posibilitar la comprensión y puesta en práctica de la presente invención por los expertos en la materia. No deben ser considerados como una limitación de su alcance, sino meramente como ilustrativos y representativos de la misma..

Ejemplos de Síntesis

Método A: Formilación de pirroles

Se agrega por goteo POCl_3 (1.1 equiv.) a dimetilformamida (3 equiv.) a -10° C seguido por el añadido del pirrol adecuado disuelto en dimetilformamida. Luego

98
100

de agitar durante dos horas, la mezcla de reacción se diluye con H_2O y se basicifica a pH 11 con 10 N KOH. El precipitado formado se recolectó por filtración, se lavó con H_2O y se secó en un horno de vacío para dar el aldehído deseado.

Método B: Saponificación de ésteres de ácido pirroicarboxílico

Una mezcla de un éster de ácido pirroicarboxílico ácido y KOH (2 – 4 equiv.) en EtOH se somete a reflujo hasta que se indica la finalización de la reacción por cromatografía en capa delgada (TLC). La mezcla de reacción enfriada se acidificó a pH 3 con HCl 1 N. El precipitado formado se recolectó por filtración, se lavó con H_2O y se secó en un horno de vacío para dar el ácido pirroicarboxílico deseado.

Método C: Amidación

A una solución atitada de un ácido pirroicarboxílico disuelto en dimetilformamida (0.3M) se agrega 1-etil-3-(3-dimetilamino- propil)carbodiimida (1.2 equiv.), 1-hidroxibenzotriazol (1.2 equiv.), y trietilamina (2 equiv.). Se agrega la amina apropiada (1 equiv.) y la reacción se agita hasta que se indica su finalización por TLC. Luego se agrega acetato de etilo a la mezcla de reacción y la solución se lava con $NaHCO_3$ saturado y salmuera (con sal extra), se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se concentró para dar la amida deseada.

Método D: Condensación de aldehídos y oxíndoles que contienen sustituyentes de ácido carboxílico

Una mezcla del oxíndol (1 equivalente), 1 equivalente del aldehído y 1 – 3 equivalentes de piperidina (o pirrolidina) en etanol (0.4 M) se agitan a 90-100°C hasta que se indica la finalización de la reacción por TLC. La mezcla luego se concentró y el residuo se acidificó con 2N HCl. El precipitado que se forma se lava con H_2O y EtOH y luego se seca en un horno de vacío para dar el producto.

99/101

Método E: Condensación de aldehidos y oxíndoles que no contienen sustituyentes de ácido carboxílico

Una mezcla del oxíndol (1 equivalente), 1 equivalente del aldehído y 1 – 3 equivalentes de piperidina (o pirrolidina) en etanol (0.4 M) se agita a 90-100° C hasta que se indica la finalización de la reacción por TLC. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y el sólido que se formase recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para dar el producto. Si no se forma un precipitado con el enfriamiento de la mezcla de reacción, la mezcla se concentra y purifica por cromatografía de columna.

C. Ejemplos de síntesis de oxíndoles

Los siguientes ejemplos de la síntesis de oxíndoles representativos no se debe interpretar como limitativos del alcance de la presente invención de manera alguna. Los conocedores de la materia podrán visualizar rutas alternativas para llegar a los oxíndoles así como otros oxíndoles que se pueden usar para preparar los compuestos de la invención, en base al material que se describe a continuación. Tales síntesis y oxíndoles, se encuentran dentro del espíritu y alcance de esta invención.

5-Amino-2-oxíndol

Se hidrogenó 5-Nitro-2-oxíndol (6.3 g) en metanol sobre paladio sobre carbono al 10% para dar 3.0 g (60% de rendimiento) del compuesto del título como un sólido blanco.

5-Bromo-2-oxíndol

Se enfrió a -10 °C 2-Oxíndol (1.3 g) en 20 mL acetonitrilo y 2.0 g N-bromosuccinimida se añadió lentamente con agitación. La reacción se agitó durante 1 hora a -10 °C y 2 horas a 0 °C. Se recolectó el precipitado, se lavó con

100
102

agua y se secó para dar 1.9 g (90 % de rendimiento) del compuesto del título.

4-Metil-2-oxindol

Se añadió oxalato de dietilo (30 mL) en 20 mL de éter seco con agitación a 19 g de etóxido de potasio suspendido en 50 mL de éter seco. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se agregaron lentamente 20 mL de 3-nitro-o-xileno en 20 mL de éter seco. La mezcla espesa rojo oscuro se calentó a reflujo durante 0.5 hr, se concentró en un sólido rojo oscuro, y se trató con 10% hidróxido de sodio hasta que casi todo el sólido se disolvió. La mezcla rojo oscuro se trató con peróxido de hidrógeno al 30% hasta que el color rojo se cambió por amarillo. La mezcla se trató alternativamente con 10% hidróxido de sodio y 30% peróxido de hidrógeno hasta que desapareció el color rojo oscuro. El sólido se separó por filtrado y el filtrado se acidificó con ácido clorhídrico 6N. El precipitado resultante se recolectó por filtración al vacío, se lavó con agua, y se secó bajo vacío para dar 9.8 g (45% de rendimiento) de ácido 2-metil-6-nitrofenilacético como un sólido blancuzco. El sólido se hidrogenó en metanol sobre paladio sobre carbón al 10% para dar 9.04 g del compuesto del título como un sólido blanco.

7-Bromo-5-cloro-2-oxindol

Se suspendieron 5-Cloro-2-oxindol (16.8 g) y 19.6 g de N-bromosuccinimida en 140 mL de acetonitrilo y se sometieron a reflujo durante 3 horas. La cromatografía en capa delgada (sílice, acetato de etilo) a 2 horas de reflujo mostró un producto de 5-cloro-2-oxindol o N-bromosuccinimida (Rf 0.8), (Rf 0.85) y un segundo producto (Rf 0.9) cuyas proporciones no cambiaron después de otra hora de reflujo. La mezcla se enfrió a 10 °C, se recolectó el precipitado por filtración al vacío, se lavó con 25 mL de etanol y succionó a secp durante 20 minutos en el embudo para dar 14.1 g de producto húmedo (56 % de

rendimiento). El sólido se suspendió en 200 mL de etanol desnaturalizado y se lavó la lechada por agitación y reflujo durante 10 minutos. La mezcla se enfrió en un baño de hielo a 10 °C. El producto sólido se recolectó por filtración al vacío, se lavó con 25 mL de etanol y se secó bajo vacío a 40 °C para dar 12.7 g (51% de rendimiento) de 7-bromo-5-cloro-2-oxindol.

5-Fluoro-2-oxindol

Se disolvió 5-Fluoroisatin (8.2 g) en 50 mL de hidrato de hidrazina y se sometió a reflujo durante 1.0 hr. Las mezclas de reacción se vertieron entonces en agua helada. El precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó en un horno de vacío para dar el compuesto del título.

5-Nitro-2-oxindol

Se disolvió 2-Oxindol (8.5 g) en 25 mL ácido sulfúrico concentrado y la mezcla se mantuvo a entre -10 y -15 °C mientras se añadían por goteo 2.1 mL de ácido nítrico fumante. Después del añadido del ácido nítrico la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 0.5 hr y se vertió en agua helada. Se recolectó el precipitado por filtración, se lavó con agua y se cristalizó a partir de ácido acético al 50%. El producto cristalino se filtró, se lavó con agua y se secó bajo vacío para dar 6.3 g (70%) de 5-nitro-2-oxindol.

5-Aminosulfonil-2-oxindol

A un recipiente de 100 ml cargado con 27 mL de ácido clorosulfónico se añadió lentamente 13.3 g de 2-oxindol. La temperatura de reacción se mantuvo por debajo de 30 °C durante el añadido. Después del añadido, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 hr, se calentó a 68 °C durante 1 hr, se enfrió, y se vertió en agua. El precipitado se lavó con agua y se secó en un horno de vacío para dar 11.0 g de 5-clorosulfonil-2-oxindol (50% de

rendimiento) que se utilizó sin más purificación.

Se añadió 5-Clorosulfonil-2-oxindol (2.1 g) a 10 mL de hidróxido de amonio en 10 mL de etanol y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró y el sólido se recolectó por filtración al vacío para dar 0.4 g (20% de rendimiento) del compuesto del título como un sólido blancuzco.

5-Isopropilaminosulfonil-2-oxindol

A un recipiente de 100 ml cargado con 27 mL ácido clorosulfónico se añadió lentamente 13.3 g 2-oxindol. La temperatura de reacción se mantuvo por debajo de 30° C durante el añadido. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 hora, se calentó a 68° C durante 1 hora, se enfrió, y se vertió en agua. El precipitado que se formó se filtró, se lavó con agua y se secó en un horno de vacío para dar 11.0 g (50%) de 5-clorosulfonil-2-oxindol que se utilizó sin más purificación.

Una suspensión de 3 g 5-clorosulfonil-2-oxindol, 1.15 g isopropilamina y 1.2 mL de piridina en 50 mL de diclorometano se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas durante cuyo lapso se formó un sólido blanco. El sólido se recolectó por filtración al vacío, se lavó la lechada con etanol caliente, se enfrió, se recolectó por filtración al vacío y se secó bajo vacío a 40° C durante la noche para dar 1.5 g (45%) de 5-isopropilaminosulfonil-2-oxindol.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.69 (s, br, 1H, NH), 7.63 (dd, J = 2 y 8 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 7 Hz, 1H, NH-SO₂), 6.93 (d, J = 8 Hz, 1H), 3.57 (s, 2H), 3.14-3.23 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 0.94 (d, J = 7 Hz, 6H, 2xCH₃).

5-Fenilaminosulfonil-2-oxindol

Una suspensión de 5-clorosulfonil-2-oxindol (1.62 g, 7 mmol), anilina (0.782 mL, 8.4 mmol) y piridina (1 mL) en diclorometano (20 ml) se agitó a

193
105

temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (300 mL) y se acidificó con ácido clorhídrico 1N (16 mL). La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio y salmuera, se secó y se concentró. El residuo se lavó con etanol (3 mL) y luego se cromatografió en gel de sílice eluyendo con metanol/ diclorometano 1:9 para dar de 5-fenilaminosulfonil-2-oxindol.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.71 (s, br, 1H, NH), 10.10 (s, br, 1H, NH), 7.57-7.61 (m, 2H), 7.17-7.22 (m, 2H), 7.06-7.09 (m, 2H), 6.97-7.0 (m, 1H), 6.88 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.52 (s, 2H).

2-Oxo-2,3-dihidro-1H-Indol-5-sulfónico ácido piridin-3-ilamida

Una solución de 5-clorosulfonil-2-oxindol (3 g) y 3-aminopiridina (1.46g) en piridina (15 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche en cuyo lapso se formó un sólido marrón. El sólido se filtró, se lavó con etanol y se secó bajo vacío para dar 1.4 g (38%) de piridin-3-ilamida de ácido 2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.74 (s, 1H, NH), 10.39 (s, 1H, SO_2NH), 8.27-8.28 (d, 1H), 8.21-8.23 (m, 1H), 7.59-7.62 (m, 2H), 7.44-7.68 (m, 1H), 7.24-7.28 (m, 1H), 6.69-6.71 (d, 1H), 3.54 (s, 2H).

MS m/z (APCI+) 290.2.

5-Feniloxindol

Se disolvió 5-Bromo-2-oxindol (5 g, 23.5 mmol) en 110 mL tolueno y 110 mL etanol con agitación y algo de calor. Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (1.9 g, 1.6 mmol) seguido por 40 mL (80 mmol) carbonato de sodio acuoso 2M. A esta mezcla se añadió ácido bencenborónico (3.7 g, 30.6 mmol) y la mezcla se calentó en un baño de aceite a 100 °C durante

106

12 horas. La reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo (500 mL), se lavó con bicarbonato de sodio saturado (200 mL), agua (200 mL), 1N HCl (200 mL) y salmuera (200 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró para dar un sólido marrón. La trituración con diclorometano dio 3.8 g (77%) de 5-fenil-2-oxindol como un sólido tostado.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.4 (br s, 1H, NH), 7.57 (dd, J = 1.8 y 7.2 Hz, 1H), 7.5 to 7.35 (m, 5H), 7.29 (m, 1H), 6.89 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.51 (s, 2H, CH_2CO).

MS m/z 209 [M^+].

En forma similar, se pueden preparar los siguientes oxindoles:

6-(3,5-Diclorofenil)-1,3-dihidroindol-2-ona

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.46 (br, 1H, NH), 7.64 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.27 (m, 2H), 7.05 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 3.5 (s, 2H).

MS-EI m/z 277/279 [M^+].

6-(4-Butilfenil)-1,3-dihidroindol-2-ona

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.39 (s, 1H, NH), 7.49 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 8 Hz, 3H), 7.17 (dd, J = 1.5 y 7.8 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H, CH_2CO), 2.60 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.57 (m, 2H, CH_2), 1.32 (m, 2H, CH_2), 0.9 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH_3).

6-(5-Isopropil-2-metoxifenil)-1,3-dihidroindol-2-ona

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.29 (br s, 1H, NH), 7.16-7.21 (m, 2H), 7.08 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.97-7.01 (m, 2H), 6.89 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.47 (s, 2H, CH_2CO), 2.86 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.19 (d, J = 6.8 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 281 [M^+].

105
107**6-(4-Etilfenil)-1,3-dihidroindol-2-ona**

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.39 (br s, 1H, NH), 7.50 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 1.6 & 7.5 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H, CH_2CO), 2.63 (q, J = 7.6 Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.20 (t, J = 7.6 Hz, 3H, CH_2CH_3).

MS-EI m/z 237 $[\text{M}]^+$.

6-(3-Isopropilfenil)-1,3-dihidroindol-2-ona

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.37 (br s, 1H, NH), 7.43 (m, 1H), 7.35-7.39 (m, 1H), 7.17-7.27 (m, 3H), 7.01 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.49 (s, 2H, CH_2CO), 2.95 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.24 (d, J = 6.8 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 251 $[\text{M}]^+$.

6-(2,4-Dimetoxifenil)-1,3-dihidroindol-2-ona

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.28 (br s, 1H, NH), 7.17 (m, 2H), 6.93 (dd, J = 1.6 & 7.6 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 2.4 & 8.5 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.45 (s, 2H, CH_2CO).

MS-EI m/z 269 $[\text{M}]^+$.

6-Piridin-3-il-1,3-dihidroindol-2-ona

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.51 (s, 1H, NH), 8.81 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.55 (dd, J = 1.8 y 5.7 Hz, 1H), 8 (m, 1H), 7.45 (dd, J = 5.7 y 9.3 Hz, 1H), 7.3 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 3.51 (s, 2H, CH_2CO).

MS m/z 210 $[\text{M}]^+$.

(3-Cloro-4-etoxifenil)-amida de ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1H-indol-4-carboxílico

A una solución de 4-carboxi-2-oxindol (200 mg, 1.13 mmol) y 3-cloro-4-

metoxifenilamina (178 mg, 1.13 mmol) en dimetilformamida (15 mL) a temperatura ambiente se añadió hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (reactivo BOP, 997 mg, 2.26 mmol) seguido por 4-dimetilaminopiridina (206 mg, 1.69 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. La reacción luego se diluyó con acetato de etilo (300 mL), se lavó con bicarbonato de sodio saturado (100 mL), agua, ácido clorhídrico 2N (100 mL), agua (3x200 mL) y salmuera. Luego se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se trituró con acetato de etilo para dar ácido 2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-4-carboxílico (3-cloro-4-metoxifenil)-amida como un sólido rosado.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.50 (s, br, 1H, NH), 10.12 (s, br, 1H, NH), 7.9 (s, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J = 2.5$ & 9 Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 2H, CH_2).

MS-EI m/z 316 $[\text{M}]^+$.

4-Carboxi-2-oxindol

Una solución de trimetilsilildiazometano en hexano (2 M) se añadió por gota a una solución de 2.01 g 2-cloro-3-carboxi-nitrobenceno en 20 mL metanol a temperatura ambiente hasta que finalizó la evolución del gas. Luego se añadió ácido acético para fraguar el exceso de trimetilsilildiazometano. La mezcla de reacción se evaporó bajo vacío y el residuo se secó en un horno durante la noche. El 2-cloro-3-metoxycarbonilnitrobenceno obtenido tenía pureza suficiente para la siguiente reacción.

Se añadió malonato de dietilo (6.0 mL) a una suspensión en hielo de 2.1 g hidruro de sodio en 15 mL DMSO. La mezcla de reacción se agitó a 100° C

457
109

durante 1 hora y luego se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió 2-Cloro-3-metoxycarbonilnitrobenzato (2.15 g) en una porción y la mezcla se calentó a 100° C durante 1.5 horas. La mezcla de reacción luego se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre agua helada, se acidificó a pH 5 y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar 3.0 g de 2-metoxycarbonil-6-nitrofenil-malonato de dimetilo.

Se sometió a reflujo 2-metoxycarbonil-6-nitrofenilmalonato de dimetilo (3.0 g) en 50 mL de ácido clorhídrico 6N durante la noche. La mezcla se concentró a sequedad, se agregaron 20 mL etanol y 1.1 g de cloruro de estaño(II) y la mezcla se sometió a reflujo durante 2 horas. La mezcla se filtró a través de Celite, se concentró y se cromatografió en gel de sílice usando acetato de etilo:hexano:acético ácido como eluyente para dar 0.65 g (37%) de 4-carboxi-2-oxindol como un sólido blanco.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 12.96 (s, br, 1H, COOH), 10.74 (s, br, 1H, NH), 7.53 (d, J = 8Hz, 1H), 7.39 (t, J = 8Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8Hz, 1H), 3.67 (s, 2H).

D. Síntesis de 2-Indolinonas sustituidas con pirrol.

Ejemplo 1

Ácido 4-Metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

Se realizó la formilación de etiléster de ácido 4-Metil-2-pirrolcarboxílico (disponible en el comercio) ted usando el método A para dar (73%) de etiléster de ácido 5-formil-4-metil-2-pirrolcarboxílico. Luego se hidrolizó usando el método B para dar ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (58%).

Se condensó oxindol (133 mg, 1 mmol) con ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-



2-carboxílico (153 mg) usando el método D para dar 268 mg (100%) del compuesto del título como un sólido anaranjado-rojizo.

$^1\text{HNMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.84 (s, br, 1H, NH), 12.84 (s, br, 1H, COOH), 10.98 (s, br, 1H, NH), 7.82 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H, H-vinilo), 7.18 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.01 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H, CH_3).

MS (modo negativo) 266.8 $[\text{M}-1]^+$.

Ejemplo 2

Ácido 4-Metil-5-(1-metil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 1-metil-1,3-dihidroindol-2-ona (147 mg, 1 mmol) con ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (153 mg) usando el método D para dar 250 mg (88%) del compuesto del título.

$^1\text{HNMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.82 (s, br, 1H, NH), 12.88 (s, br, 1H, 7.83 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H, H-vinil), 7.26 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.02-7.09 (m, 2H), 6.70 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H, CH_3).

MS m/z 283.0 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 3

Metiléster del ácido 4-metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

Se condensó oxindol (105 mg, 0.79 mmol) con 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico metiléster del ácido (110 mg, 0.67 mmol) usando el método E para dar 153.2 mg (81%) del compuesto del título.

$^1\text{HNMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.98 (s, br, 1H, NH), 10.97 (s, br, 1H, NH), 7.82 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H, H-vinil), 7.2 (dt, J = 1.2 & 7.7 Hz, 1H), 7.01

105
111

(dt, $J = 1.2, 7.7$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 2$ Hz, 1H).

MS (ES) m/z 283 [$M^+ + 1$].

Ejemplo 4

Etiléster del ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 5-Cloro-1,3-dihidroindol-2-ona (2.22 g, 13.2 mmol) con etiléster del ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (2.43 g) usando el método E para dar 4.1 g (94%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.95 (s, br, 1H, NH), 7.96 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-4), 7.78 (s, 1H, H-vinil), 7.18 (dd, $J = 2.2$ & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 7.34 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-3'), 4.27 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

MS-EI m/z 330 [M^+].

Ejemplo 5

Ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

Una mezcla de etiléster del ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (1.3 g, 4 mmol) y hidróxido de potasio en metanol (25 mL) y etanol (25 mL) se calentó a reflujo durante durante la noche. Los materiales insolubles se eliminaron por filtración y la mezcla se neutralizó con ácido clorhídrico 6N para dar 0.676 g (70%) del compuesto del título.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.80 (s, br, 1H, NH), 12.90 (s, br, 1H, COOH), 11.06 (s, br, 1H, NH), 8.02 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-4), 7.81 (s, 1H, H-vinil), 7.20 (dd, $J = 1.8$ & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 6.72 (d, $J = 1.8$

112

Hz, 1H, H-3'), 2.35 (s, 3H, CH₃).

MS-EI m/z 302 [M^+].

Ejemplo 6

(3-pirrolidin-1-il-propil)amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (0.16 g, 0.76 mmol) con (3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (0.2 g, preparada por el método C) para dar 60 mg (17%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 8.42 (t, J = 5.8 Hz, 1H, CONHCH₂), 8.12 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-4), 7.78 (s, 1H, H-vinil), 7.30 (dd, J = 1.8 & 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 6.77 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-3'), 3.22-3.31 (m, 2H, CH₂), 2.38-2.43 (m, 6H, 3xCH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.62-1.71 (m, 6H, 3xCH₂).

MS-EI m/z 456 y 458 [$M^+ - 1$ y $M^+ + 2$].

Ejemplo 7

(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (0.16 g, 0.75 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (0.2 g, preparada por el método C) para dar 30 mg (8%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 8.40 (m, 1H, CONHCH₂), 8.12 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-4), 7.78 (s, 1H, H-vinilo), 7.30 (dd, J = 1.5 & 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7), 6.78 (d, J = 2.4 Hz,

1H, H-3'), 3.23 (m, 2H, CH₂), 2.38-2.45 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂), 0.93 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 458 y 460 [*M*⁺-1 y *M*⁺+2].

Ejemplo 8

(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1*H*-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (212 mg, 1 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (preparado a partir de el pirrol-2-carboxilato de etilo por el método A, B y luego C) para dar 162 mg (38%) del compuesto del título.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.53 (s, br, 1H, NH), 11.06 (s, br, 1H, NH), 8.37 (t, 1H, CONHCH₂), 7.89 (m, 2H), 7.32 (dd, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.80-6.84 (m, 2H), 3.3 (m, 2H, CH₂), 2.45-2.55 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 430 y 432 [*M*⁺-1 y *M*⁺+1].

Ejemplo 9

(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(2-Oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1*H*-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 6-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (209 mg, 1 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-1*H*-pirrol-2-carboxílico para dar 182 mg (42%) del compuesto del título.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.56 (s, br, 1H, NH), 11.06 (s, br, 1H, NH), 8.36 (t, 1H, CONHCH₂), 7.77 (s, 1H, H-vinil), 7.73 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.11 (s, 1H), 6.96 (m, 1H), 6.80 (m, 1H), 3.31-3.32 (m, 2H, CH₂), 2.46-2.53 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 0.96 (t, *J* = 6.9

112
114

Hz, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

MS-EI m/z 428 [M^+].

Ejemplo 10

(2-dietilaminoetil)-metil-amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (212 mg, 1 mmol) con (2-dietilaminoetil)metilamida del ácido 5-formil-1H-pirrol-2-carboxílico para dar 246 mg (55%) del compuesto del título.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.54 (s, br, 1H, NH), 11.06 (s, br, 1H, NH), 7.90 (m, 2H), 7.33 (dd, $J = 1.8$ & 8.4 Hz, 1H), 6.82-6.85 (m, 3H), 3.55 (s, br, 2H, CH_2), 3.25 (s, br, 3H, NCH_3), 2.57 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2), 2.45 (m, 4H, $N(CH_2CH_3)_2$), 0.91 (m, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

MS-EI m/z 444 y 446 [$M^+ - 1$ y $M^+ + 1$].

Ejemplo 11

(2-dietilaminoetil)metilamida del ácido 5-(2-Oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 6-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (209 mg, 1 mmol) con (2-dietilaminoetil)metilamida del ácido 5-formil-1H-pirrol-2-carboxílico para dar 277 mg (63%) del compuesto del título.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.58 (s, br, 1H, NH), 11.04 (s, br, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, H-vinil), 7.73 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.33-7.36 (m, 2H), 7.11 (s, 1H), 6.84 (m, 1H), 6.78 (m, 1H), 3.55 (s, br, 2H, CH_2), 3.25 (s, br, 3H, NCH_3), 2.58 (t, 2H, CH_2), 2.44 (m, 4H, $N(CH_2CH_3)_2$), 0.92 (m, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

115

Ejemplo 12**(3-dietilaminopropil)amida del ácido 3-Metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico**

Se condensó Oxindol (66.5 mg, 0.5 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (preparado a partir de etiléster del ácido 3-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico por el método B luego C) para dar 39 mg (21%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.34 (s, br, 1H, NH), 10.88 (s, br, 1H, NH), 7.62-7.67 (m, 3H), 7.17 (m, 1H), 6.99 (m, 1H), 6.87 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 1$ Hz, 1H), 3.28-3.32 (m, 2H, CH_2), 2.41-2.48 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 380 [M^+].

Ejemplo 13**(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico**

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (106 mg, 0.5 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico para dar 35 mg (15%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.35 (s, br, 1H, NH), 11.00 (s, br, 1H, NH), 7.89 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-4), 7.80 (s, 1H, H-vinil), 7.74 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 7.31 (dd, $J = 1.9$ & 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 6.63 (s, 1H, H-3'), 3.26 (m, 2H, CH_2), 2.41-2.48 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 458 y 460 [$\text{M}^+ - 1$ y $\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 14**(3-dietilaminopropil)amida del ácido 3-Metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico**

Se condensó 6-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (105 mg, 0.5 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico para dar 67.8 (30%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.37 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 7.23-7.73 (m, 11H), 3.29 (m, 2H, CH_2), 2.41-2.48 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.84 (m, 2H, CH_2), 0.94 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 456 [M^+].

Ejemplo 15**(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(5-Metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico**

Se condensó 5-Metoxi-1,3-dihidroindol-2-ona (82.5 mg, 0.5 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico para dar 80 mg (39%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.45 (s, br, 1H, NH), 10.70 (s, br, 1H, NH), 7.68-7.70 (m, 2H), 7.32 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.72-6.79 (m, 2H), 6.60 (s, 1H), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.28 (m, 2H, CH_2), 2.41-2.48 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.83 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 410 [M^+].

Ejemplo 16**(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(6-Metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico**

Se condensó 6-Metoxi-1,3-dihidroindol-2-ona (82.5 mg, 0.5 mmol) con (3-

45
117

dietilaminopropil)amida ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico para dar 63 mg (31%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.22 (s, br, 1H, NH), 10.66 (s, br, 1H, NH), 7.39-7.63 y 6.37-6.55 (m, 6H), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.3 (m, 2H, CH_2), 2.45 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.28 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 410 [M^+].

Ejemplo 17

(2-dietilamino-etil)amida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico

Etiléster del ácido 4,5,6,7-Tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico (May, Donald A.; Lash, Timothy D.; *J. Org. Chem.*, 1992, 57:18, 4820-4828) se efectuó la formilación usando el método A luego el B para dar ácido 3-formil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico.

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (1.43 g, 6.8 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 3-formil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico (1.97 g) para dar 2.2 g (87%) del compuesto del título como sólido amarillo anaranjado.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.47 (s, 1H, NH), 11.0 (s, 1H, NH), 8.0 (d, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, CH), 7.28 (dd, $J = 2.1$ y 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.16 (m, 1H, ArH), 6.8 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, ArH), 3.3 (s, 2H, CONH), 2.5 (m, 6H, $3 \times \text{NCH}_2$), 2.78 (br m, 2H, pirrole CH_2), 2.72 (br m, 2H, pirrole CH_2), 1.7 (br m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.74 (br s, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 484 y 486 [$\text{M}^+ - 1$ y $\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 18**(3-dietilamino-propil)amida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico**

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (20 mg, 0.1 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 3-formil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico (30 mg) para dar 33 mg (46%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.9 (s, 1H, NH), 8.0 (m, 1H, NH), 7.68 (m, 1H, ArH), 7.4 (m, 1H, ArH), 7.28 (d, $J = 1.9$ y 8.5 Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 2.7 (br m, 4H, $2 \times \text{NCH}_2$), 2.4 (m, 8H, $4 \times \text{NCH}_2$), 1.7 (br m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.6 (br m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 499 y 501 [M^+ y $\text{M}^+ + 2$].

Ejemplo 19**(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico**

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (80 mg, 0.4 mmol) con (3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 3-formil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico (120 mg) para dar 43 mg (22%) del compuesto del título como un sólido amarillo tostado.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.4 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, NH), 8.0 (m, 1H, NH), 7.69 (m, 1H, ArH), 7.49 (m, 1H, ArH), 7.28 (d, $J = 1.7$ y 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 3.3 (br m, 2H, $2 \times \text{NCH}_2$), 2.8 (m, 4H, $2 \times \text{pirroleCH}_2$), 2.5 (br m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.6 (br m, 8H, $2 \times \text{pirroleCH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ y CONHCH_2).

MS-EI m/z 497 y 499 [M^+ y $\text{M}^+ + 2$].

Ejemplo 20

(2-dietilaminoetil)amida del ácido 3-(2-Oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico

Se condensó (2-dietilaminoetil)amida del ácido 6-Piridin-3-il-1,3-dihidroindol-2-ona (60 mg, 0.4 mmol) con ácido 3-formil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isolindol-1-carboxílico (80 mg) para dar 50 mg (38%) del compuesto del título como un sólido rojizo.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.4 (s, 1H, NH), 11 (s, 1H, NH), 8.9 (d, 1H, NH), 8.7 (dd, 1H, ArH), 8.1 (dd, 1H, ArH), 7.9 (d, 1H, ArH), 7.6 (s, 1H, CH), 7.5 (dd, 1H, ArH), 7.3 (dd, 1H, ArH), 7.1 (m, 2H, ArH), 3.35 (m, 2H, CONHCH₂), 2.8 (m, 4H, 2pirroleCH₂), 2.5 (br m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ y NCH₂), 1.75 (br s, 4H, 2pirroleCH₂CH₂), 0.9 (t, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 484 [M⁺].

Ejemplo 21

(3-dietilaminopropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

A una mezcla de cloruro de benzoilo (1 equiv.) y cloruro de aluminio (1 equiv.) en dicloroetano a 0°C se añadió 3,5-dimetil-2-pirrolcarboxilato de etilo (1 equiv.). La mezcla se agitó a 80°C durante 4 hs. La mezcla luego se extrajo con acetato de etilo (EtOAc) y H₂O. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó y se concentró para dar (51%) de ácido 4-benzoil-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-carboxílico.

Una mezcla de etiléster del ácido 4-benzoil-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-carboxílico (4.13 g, 15.2 mmol) y nitrato de amonio cárico (33 g, 4equiv.) en 50 mL

de tetrahidrofurano (THF):ácido acético (HOAc):H₂O 1:1:1 se sometió a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción luego se enfrió, se extrajo con EtOAc y luego se basificó a pH 9 con carbonato de sodio. La capa orgánica luego se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró seguido por cromatografía en columna para dar 3.25 g (75%) de etiléster del ácido 4-benzoi-5-formil-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico como sólido amarillo.

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidro-indol-2-ona con ácido 4-benzoi-5-formil-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico usando el método D para dar ácido 4-benzoi-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ildenemetil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico.

El ácido carboxílico anterior luego se acopló con N,N-dietil-1,3-propanediamina usando el método C para dar el compuesto del título.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.96 (m, 1H, CONHCH₂), 7.76 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.68 (t, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.40 (s, 2H) 7.33 (dd, *J* = 1.6 & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 3.33 (m, 2H, CH₂), 2.42-2.46 (m, 6H, 3xCH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.65 (m, 2H, CH₂), 0.94 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS Impacto del electrones *m/z* 564 [M⁺+1].

Ejemplo 22

(3-morfolin-4-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoi-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.10 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 7.92 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (m, 2H), 7.69 (t, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.42 (m, 2H), 7.33 (dd, *J* = 1.9 & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 3.56 (m, 4H, 2xCH₂), 3.33 (m, 2H, CH₂), 2.35 (m, 6H, 3xCH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂).

Ejemplo 23

(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-3-metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.18 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 8.01 (m, 1H, CONHCH₂), 7.74 (m, 1H), 7.67 (m, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.32 (s, 1H, H-vinil), 7.17 (m, 1H), 6.92 (m, 1H), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.44 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.65-1.75 (m, 6H, 3xCH₂).

MS Impacto de electrones m/z 482 [M⁺].

Ejemplo 24

(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.01 (s, 1H, NH), 11.16 (br s, 1H, NH), 7.98 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.33 (dd, $J = 2.0$ & 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.42-2.47 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.64 (m, 4H, 2xCH₂).

Ejemplo 25

(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-3-metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.15 (s, 1H, NH), 11.16 (br s, 1H, NH), 7.98 (m, 1H, CONHCH₂), 7.77 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.69 (m, 1H), 7.53-7.63 (m, 4H), 7.44 (m, 2H), 7.33-7.37 (m, 2H), 7.24 (s, 2H), 7.12 (s, 1H), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.43-2.48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.12 (s, 3H, CH₃), 1.74 (m, 2H, CH₂), 1.69 (m, 4H, 2xCH₂).

MS Impacto de electrones m/z 558 [M⁺].

Ejemplo 26

120
122

(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(6-metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.99 (s, 1H, NH), 11.05 (br s, 1H, NH), 7.93 (m, 1H, CONHCH₂), 7.72 (m, 2H), 7.65 (m, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.15 (s, 1H, H-vinil), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-4), 6.51 (dd, J = 2.3 & 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.44 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-7), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (m, 2H, CH₂), 2.42-2.46 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.72 (m, 2H, CH₂), 1.65 (m, 4H, 2xCH₂).

MS Impacto de electrones m/z 512 [M^+].

Ejemplo 27

(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.24 (s, 1H, NH), 10.90 (br s, 1H, NH), 7.97 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.69 (m, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.24 (s, 1H, H-vinil), 6.79 (m, 2H), 6.66 (m, 1H), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.43-2.48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃), 1.71 (m, 2H, CH₂), 1.66 (m, 4H, 2xCH₂).

MS Impacto de electrones m/z 512 [M^+].

Ejemplo 28

(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Benzoil-5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1*H*-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.20 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 8.03 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.38 (s, 1H, H-vinil), 7.08 (m, 1H), 7.01 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.42-2.48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.65 (m, 4H, 2xCH₂).

MS Impacto de electrones m/z 500 [M^+].

Ejemplo 29

(3-dietilaminopropil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidro-indol-2-ona con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 4-acetil-5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (preparado a partir de etiléster del ácido 4-acetil-5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico por método B luego C) para dar el compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.19 (s, 1H, NH), 11.19 (br s, 1H, NH), 8.15 (m, 1H, CONHCH₂), 8.11 (s, 1H, H-vinil), 7.72 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-4), 7.38 (dd, J = 1.8 & 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7), 3.27 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.46 (m, 9 H, CH₃ & 3xCH₂), 1.64 (m, 2H, CH₂), 0.93 (t, J = 7.1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Ejemplo 30

(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.14 (m, 1H, CONHCH₂), 8.10 (s, 1H, H-vinil), 7.70 (d, 1H, H-4), 7.36 (dd, J = 1.6 & 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.85 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-7), 3.32 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.35-2.48 (m, 6H, 3xCH₂), 1.65-1.71 (m, 6H, 3xCH₂).

MS m/z 499 & 501 [M^+] & [$M^+ + 2$].

Ejemplo 31 *↗ morfolin.*

(3-morpholin-4-ilpropil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.20 (s, 1H, NH), 11.26 (br s, 1H, NH), 8.09 (m, 2H, H-vinilo & CONHCH₂), 7.73 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-4), 7.38 (dd, J = 1.5

127
124

& 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 3.55 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3.26 (m, 2H, CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3CO), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.35 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 1.68 (m, 2H, CH_2).

MS-EI m/z 514 & 516 [$\text{M}^+ - 1$] & [$\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 32

(3-hidroxipropil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.17 (s, 1H, NH), 11.25 (br s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, H-vinil), 8.03 (m, 1H, CONHCH_2), 7.71 (br s, 1H, H-4), 7.37 (br d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 4.51 (br s, 1H, OH), 3.51 (br s, 2H, CH_2), 3.36 (m, 2H, CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3CO), 2.43 (s, 3H, CH_3), 1.70 (m, 2H, CH_2).

MS-EI m/z 445 & 447 [$\text{M}^+ - 1$] & [$\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 34

(2-morfolin-4-iletil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.19 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, H-vinil), 7.84 (m, 1H, CONHCH_2), 7.71 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-4), 7.38 (dd, $J = 1.8$ & 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7), 3.58 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3.40 (m, 2H, CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3CO), 2.49 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.45 (m, CH_3 & CH_2).

MS-EI m/z 500 & 502 [$\text{M}^+ - 1$] & [$\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 35

(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

129
125

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.17 (s, 1H, NH), 11.23 (s, 1H, NH), 8.11 (s, 1H, H-vinil), 7.91 (m, 1H, CONHCH₂), 7.73 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.39 (dd, J = 1.9 & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.88 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7), 3.40 (m, 2H, CH₂), 2.62 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.69 (m, 4H, 2xCH₂).

Ejemplo 36

[2-(4-hidroxifenil)etil]amida del ácido 4-Acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.21 (s, 1H, NH), 11.18 (s, 1H, OH), 9.09 (s, 1H, NH), 8.06-8.10 (m, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 3.42 (m, 2H, CH₂), 2.72 (m, 2H, CH₂), 2.56 (s, 3H, CH₃CO), 2.37 (s, 3H, CH₃).

MS-EI m/z 507 & 509 [M^+ -1] & [M^+ +1].

Ejemplo 37

(3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

Una mezcla de hidrocloruro de 2-aminoacetofenona (1 equiv.), isobutirilacetato de etilo (1.2 equiv.) y acetato de sodio (2.4 equiv.) en H₂O se agitó a 100° C durante 18 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. La capa acuosa se decantó y el aceite se disolvió en acetato de etilo. Luego se lavó con agua y salmuera y luego se secó para dar (93%) de etiléster del ácido 2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico como un aceite rojo amarronado.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.21 (s, br, 1H, NH), 7.14-7.27 (m, 5H), 6.70 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.02 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.65 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.22 (d, J = 7.5 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1.04 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

124
126

MS-EI m/z 257 [M^+].

Al pirrol anterior se le efectuó la formulación usando el método A para dar etiléster del ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (41%) como un sólido rojizo.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.35 (s, br, 1H, NH), 9.14 (s, 1H, CHO), 7.36 (s, 5H), 3.96 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.74 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.29 (d, J = 6.9 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.90 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3).

MS-EI m/z 285 [M^+].

Se hidrolizó el éster del ácido pirrolcarboxílico usando el método B para dar (57%) de ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxílico como un sólido beige.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.28 (s, br, 1H, COOH), 12.02 (s, br, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, CHO), 7.35 (s, 5H), 3.81 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.28 (d, J = 6.9 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 257 [M^+].

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (120 mg, 0.31 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (preparada por el método C) para dar 120 mg (71%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.23 (s, br, 1H, NH), 11.08 (s, br, 1H, NH), 7.38-7.55 (m, 7H, Ar-H & CONHCH_2), 7.30 (s, 1H, H-vinil), 7.26 (dd, J = 1.8 & 7.8 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.36 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.07 (m, 2H, CH_2), 2.34 (q, J = 7.1 Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.22 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH_2), 1.40 (m, 2H, CH_2), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.86 (t, J = 7.1 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 565.1 [$M^+ + 1$].

125
127**Ejemplo 38****(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (127 mg, 0.28 mmol) con 3-pirrolidin-1-ilpropilamina (43 mg, 0.336 mmol) para dar 140 mg (66%) del compuesto del título.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14.40 (s, br, 1H, NH), 7.38-7.47 (m, 7H), 7.23-7.27 (m, 2H), 6.84 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.36 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.08 (m, 2H, CH₂), 2.30 (m, 4H, 2xCH₂), 2.20 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.62 (m, 4H, 2xCH₂), 1.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.31 (d, J = 7.2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 560 y 562 [M⁺-1 y M⁺+1].

Ejemplo 39**(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (57 ,g. 0.27 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (120 mg) para dar 76 mg (53%) del compuesto del título como sólido amarillo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14.23 (s, br, 1H, NH), 11.09 (s, br, 1H, NH), 7.38-7.51 (m, 6H), 7.25-7.28 (m, 2H), 7.19 (t, 1H, CONHCH₂), 6.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.43 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.11 (m, 2H, CH₂), 2.28-2.39 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, CH(CH₃)₂), 0.85 (t, J = 7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 548 y 550 [M⁺-1 y M⁺+1].

Ejemplo 40**[3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico**

128
128

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (53 mg, 0.25 mmol) con [3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]amida del ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (300 mg) para dar 65 mg del compuesto del título.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.22 (s, br, 1H, NH), 11.08 (s, br, 1H, NH), 7.23-7.50 (m, 9H), 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.37 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.05 (m, 2H, CH₂), 2.24 (m, 8H, 4xCH₂), 2.11 (m, 5H, CH₂ & CH₃), 1.42 (m, 2H, CH₂), 1.31 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 589 y 591 [*M*⁺ -1 y *M*⁺+1].

Ejemplo 41

Ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-isopropil-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (170 mg, 0.8 mmol) se condensó con ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (205 mg) usando el método D para dar 210 mg (58%) del compuesto del título como sólido amarillo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.31 (s, br, 1H, NH), 11.16 (s, br, 1H, NH), 7.26-7.44 (m, 7H), 7.11 (s, 1H, H-vinil), 6.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.78 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.34 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 452 [*M*⁺+1].

Ejemplo 42

(2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-metil-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (44 mg, 0.21 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (70 mg, preparado de la misma manera como el isopropilo análogo, anterior) para dar 0.03 g (27%) del compuesto del título como sólido amarillo.

127
124

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.87 (s, br, 1H, NH), 11.11 (s, br, 1H, NH), 7.36-7.51 (m, 6H), 7.26 (dd, J = 1.8 & 8.1 Hz, 1H), 7.2 (s, 1H, H-vinil), 7.09 (m, 1H, CONHCH₂), 6.83 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.17 (m, 2H, NCH₂), 2.48 (m, CH₃), 2.29-2.35 (m, 6H, 3xNCH₂), 1.59 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 518 y 520 [M^+ -1 y M^+ +1].

Ejemplo 43

(2-pirrolidin-1-iletíl)amida del ácido 5-[6-(2-Metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(2-Metoxifenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (50 mg, 0.21 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletíl)amida del ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (70 mg) para dar 0.04 g (35%) del compuesto del título como un sólido anaranjado amarillo.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.82 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 7.48 (m, 2H), 7.43 (m, 1H), 7.38 (m, 2H), 7.32 (m, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.16 (s, 1H, H-vinil), 7.08 (m, 2H), 7.03 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.19 (m, 2H, NCH₂), 2.49 (m, CH₃), 2.32-2.38 (m, 6H, 3xNCH₂), 1.59 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 546 [M^+].

Ejemplo 44

(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (46 mg, 0.22 mmol) con (2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (65 mg) para dar 60 mg (55%) del compuesto del título como sólido amarillo.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.86 (s, br, 1H, NH), 11.09 (s, br, 1H, NH), 7.47-7.49 (m, 2H), 7.38-7.41 (m, 4H), 7.26 (dd, J = 2.2 & 8.3 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H,

128
130

H-vinil), 7.04 (m, 1H, CONHCH₂), 6.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.15 (m, 2H, NCH₂), 2.48 (m, CH₃), 2.16 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, 3xNCH₂), 2.02 (s, 6H, 2xNCH₃).

MS m/z 493 y 494.8 [M^+ y $M^+ + 2$].

Ejemplo 45

(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-[6-(2-Metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(2-Metoxifenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (53 mg, 0.22 mmol) con (2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (65 mg) para dar 0.05 g (44%) del compuesto del título como una goma anaranjada.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.82 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 7.37-7.52 (m, 5H), 7.32 (m, 1H), 7.22-7.27 (m, 2H), 7.16 (s, 1H), 7.08 (m, 2H), 7.03 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.15 (m, 2H, NCH₂), 2.49 (m, CH₃), 2.16 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, NCH₂), 2.02 (s, 6H, 2xNCH₃).

MS m/z 521 [$M^+ + 1$].

Ejemplo 46

Etiléster del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (60 mg, 0.29 mmol) con etiléster del ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (75 mg) para dar 78 mg (60%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14.01 (s, br, 1H, NH), 11.13 (s, br, 1H, NH), 7.42-7.46 (m, 3H), 7.27-7.34 (m, 4H), 7.12 (s, 1H), 6.84 (dd, $J = 2.2$ & 8.3 Hz, 1H), 3.99-4.03 (m, 2H, OCH₂CH₃), 2.61 (s, 3H, CH₃), 0.98-1.03 (m, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 450 y 452 [$M^+ - 1$ y $M^+ + 1$].

129
131**Ejemplo 47****(3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó 5-bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (0.47 g, 2.2 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (0.75 g) para dar 0.11 g (42%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.86 (s, br, 1H, NH), 7.42-7.46 (m, 3H), 7.37-7.50 (m, 7H), 7.24-7.28 (m, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.09 (m, 2H, NCH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, 2xNCH₂CH₃), 2.26 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, NCH₂), 1.42 (m, 2H, NCH₂), 0.87 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 535.0 y 537 [M⁺ y M⁺+2].

Ejemplo 48**(2-dimetilamino-etil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Una mezcla de 3-oxobutirato de *tert*-butilo y nitrito de sodio (1 equiv.) en ácido acético se agitó a temperatura ambiente para dar *tert*-butil-2-hidroximino-3-oxobutirato.

Se agitaron etil-3-oxobutirato (1 equiv.), polvo de zinc (3.8 equiv.) y *tert*-butil-2-hidroximino-3-oxobutirato crudo en ácido acético a 60°C durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó en H₂O y el filtrado se recolectó para dar (65%) 2-*tert*-butiloxicarbonil-3,5-dimetil-4-etoxicarbonilpirrol.

Una mezcla de 2-*tert*-butiloxicarbonil-3,5-dimetil-4-etoxicarbonilpirrol y ortoformato de trietilo (1.5 equiv.) en ácido trifluoroacético se agitó a 15°C durante 1 hora. La reacción se concentró y el residuo se purificó para dar

130
132

(64%) 2,4-dimetil-3-etoxicarbonil-5-formilpirrol como agujas amarillas.

Se hidrolizó 2,4-Dimetil-3-etoxicarbonil-5-formilpirrol usando el método B para dar (90%) ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 12 (br s, 2H, NH y CO_2H), 9.58 (s, 1H, CHO), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3).

MS m/z 267 [M^+].

5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (0.17 g, 0.8 mmol) se condensó con (2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (0.2 g, preparada por el método C) usando el método B para dar 0.3 g (63%) del compuesto del título como sólido amarillo.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.60 (s, br, 1H, NH), 10.94 (s, br, 1H, NH), 8.07 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-4), 7.75 (s, 1H, H-vinil), 7.44 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, CONHCH_2), 7.24 (dd, $J = 1.6$ & 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 3.26-3.33 (m, 2H, NCH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.38 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, NCH_2), 2.18 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 430 y 432 [M^+-1 y M^++1].

Ejemplo 49

(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (0.17 g, 0.8 mmol) con (2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (0.2 g) para dar 0.13 g (36%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.59 (s, br, 1H, NH), 10.93 (s, br, 1H, NH), 7.85 (d, $J = 7.92$ Hz, 1H, H-4), 7.63-7.65 (m, 3H), 7.40-7.47 (m, 3H), 7.32-7.38 (m,

131
133

1H, Ar-H), 7.30 (dd, $J = 1.6$ & 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.11 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-7), 3.28-3.34 (m, 2H, NCH_2), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.38 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, NCH_2), 2.18 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 428 [M^+].

Ejemplo 50

(2-dimetilamino-etil)amida del ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Cloro-1,3-dihidroindol-2-ona (0.1 g, 0.6 mmol) con (2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0.15 g) para dar 0.22 g (90%) del compuesto del título como sólido amarillo.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.98 (, br, 1H, NH), 7.96 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-4), 7.75 (s, 1H, H-vinil), 7.50 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CONHCH_2), 7.12 (dd, $J = 2.0$ & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 3.26-3.31 (m, 2H, NCH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 2.36 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, NCH_2), 2.17 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 386 [M^+].

Ejemplo 51

(2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (0.17 g, 0.8 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0.2 g) para dar 0.09 g (26%) del compuesto del título como sólido amarillo.

^1H NMR (360 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.98 (, br, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-4), 7.76 (s, 1H, H-vinil), 7.42 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CONHCH_2), 7.24 (dd, $J = 1.7$ & 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-7),

132
134

3.23-3.32 (m, 2H, NCH_2), 2.46-2.55 (m, 6H, $3\times\text{NCH}_2$), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.42 (s, 3H, CH_3), 0.96 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, $2\times\text{NCH}_2\text{CH}_3$).

MS-EI m/z 458 y 460 [M^+-1 y M^++1].

Ejemplo 52

(2-pirrolidin-1-il-etil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (0.09 g, 0.4 mmol) con (2-pirrolidin-1-il-etil)amida del 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0.1 g) para dar 0.14 g (81%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.98 (, br, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-4), 7.76 (s, 1H, H-vinil), 7.53 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CONHCH_2), 7.24 (dd, $J = 1.9$ & 8.5 Hz, 1H, H-6), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-7), 3.29-3.35 (m, 2H, NCH_2), 2.54 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, NCH_2), 2.47 (m, under DMSO), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 1.66-1.69 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

MS-EI m/z 458 y 458 [M^+-1 y M^++1].

Ejemplo 53

(3-imidazol-1-il-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (0.09 g, 0.4 mmol) con ácido (3-imidazol-1-il-propil)amida 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0.1 g) para dar 0.1 g (59%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.63 (s, br, 1H, NH), 10.99 (, br, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-4), 7.77 (s, 1H, H-vinil), 7.71 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, CONHCH_2), 7.65 (s, 1H, Ar-H), 7.25 (dd, $J = 2.2$ & 8.4 Hz, 1H, H-6), 7.20 (s, 1H, Ar-H), 6.89 (s, 1H, Ar-H), 6.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 4.02 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H,

133
135

NCH_2), 3.18 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, NCH_2), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 1.93 (m, 2H, CH_2).

MS-EI m/z 467 y 469 [$\text{M}^+ - 1$ y $\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 54

(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-[6-(2-Metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(2-Metoxifenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (30 mg, 0.13 mmol) con (2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (30 mg) para dar 0.06 g (100%) del compuesto del título como una goma amarilla anaranjada.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.60 (s, br, 1H, NH), 10.89 (s, br, 1H, NH), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H, H-vinil), 7.46 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CONHCH_2), 7.28-7.35 (m, 2H), 6.99-7.11 (m, 4H), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.27-3.31 (m, 2H, NCH_2), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.39 (s, 3H, CH_3), 2.37 (m, 2H, NCH_2), 2.18 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 458 [M^+].

Ejemplo 55

(2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-[6-(3-Metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(3-Metoxifenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (30 mg, 0.13 mmol) con (2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (30 mg) para dar 8 mg (14%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

^1H NMR (360 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.59 (s, br, 1H, NH), 10.92 (s, br, 1H, NH), 7.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H, H-vinil), 7.42 (m, 1H, CONHCH_2), 7.36 (d, $J =$

134
136

7.8 Hz, 1H), 7.29 (dd, $J = 1.6$ & 7.6 Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.91 (dd, $J = 2.8$ & 7.8 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.21-3.33 (m, 2H, NCH_2), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 2.36-2.40 (m, 2H, NCH_2), 2.18 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 458 [M^+].

Ejemplo 56

(2-dietilaminoetil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (80 mg, 0.4 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0.1 g) usando el método B para dar 79 mg (46%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.66 (s, br, 1H, NH), 10.95 (, br, 1H, NH), 8.15 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H, H-vinil), 7.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.40-7.47 (m, 4H), 7.31 (m, 1H), 6.95 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.2-3.31 (m, 2H, NCH_2), 2.46-2.55 (m, 6H, $3 \times \text{NCH}_2$), 2.44 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, $2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3$).

MS-EI m/z 456 [M^+].

Ejemplo 57

(2-pirrolidin-1-iletíl)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (0.04 g, 0.2 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletíl)amida ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0.04 g) para dar el compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.65 (s, br, 1H, NH), 10.96 (, br, 1H, NH), 8.15 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H, H-vinil), 7.71 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.49 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, CONHCH_2), 7.41-7.46 (m, 3H), 7.31 (m, 1H), 6.95 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H),

138
132

4.08 (m, 4H, 2x NCH₂), 3.32 (m, 2H, NCH₂), 2.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, NCH₂), 2.47 (m, under DMSO), 2.43 (s, 6H, 2xCH₃), 1.66 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 454 [M⁺].

Ejemplo 58

(3-imidazol-1-ilpropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (8 mg, 0.04 mmol) con (3-imidazol-1-ilpropil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (10 mg) para dar 10 mg (59%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.67 (s, br, 1H, NH), 10.96 (, br, 1H, NH), 8.16 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H, H-vinil), 7.65-7.72 (m, 4H), 7.44 (m, 3H), 7.31 (m, 1H, CONHCH₂), 7.21 (s, 1H, Ar-H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.19 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, CONHCH₂), 2.44 (s, 6H, 2xCH₃), 1.93 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

MS-EI *m/z* 465 [M⁺].

Ejemplo 59

(2-dietilaminoetil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (0.08 g, 0.4 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (0.1 g) para dar 65 mg (38%) del compuesto del título como sólido amarillo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.99 (, br, 1H, NH), 7.86 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.62-7.66 (m, 3H), 7.40-7.47 (m, 3H), 7.28-7.36 (m, 2H), 7.10 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 3.26 (m, 2H, NCH₂), 2.46-2.55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 456 [M⁺].

Ejemplo 60**(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó 6-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (30 mg, 0.15 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (40 mg) para dar 5.9 mg (8.5%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.60 (s, br, 1H, NH), 10.99 (, br, 1H, NH), 7.86 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.63-7.66 (m, 3H), 7.51 (m, 1H, CONHCH₂), 7.45 (m, 2H), 7.28-7.36 (m, 2H), 7.10 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 3.31 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.55 (t, J = 6.6 Hz, 2H, NCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 454 [M^+].

Ejemplo 61**(3-imidazol-1-ilpropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó 6-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (8 mg, 0.04 mmol) con (3-imidazol-1-ilpropil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (10 mg) para dar 7.3 mg (43%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, br, 1H, NH), 10.99 (, br, 1H, NH), 7.86 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62-7.70 (m, 5H), 7.45 (m, 2H), 7.35 (m, 1H), 7.30 (dd, J = 1.4 & 8.2 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.10 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.02 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 3.19 (m, 2H, NCH₂ CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.93 (t, J = 6.9 Hz, 2H, NCH₂).

MS-EI m/z 465 [M^+].

Ejemplo 62

(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-[6-(3,5-Diclorofenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(3,5-Diclorofenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (64 mg, 0.23 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (60 mg) para dar 53 mg (44%) del compuesto del título como un sólido marrón claro.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, br, 1H, NH), 10.99 (s, 1H, NH), 7.89 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-4), 7.69-7.71 (m, 3H), 7.55 (m, 1H, CONHCH₂), 7.37 (m, 2H), 7.14 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-7), 3.27 (m, 2H, NCH₂), 2.48-2.58 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, 3xNCH₂CH₃).

MS m/z 526.9 [$M^+ + 1$].

Ejemplo 63

(2-dietilaminoetil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-Piridin-3-il-1,3-dihidroindol-2-ona (40 mg, 0.19 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para dar 29 mg (33%) del compuesto del título como sólido naranja claro.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, br, 1H, NH), 11.05 (s, br, 1H, NH), 8.86 (s, br, 1H), 8.53 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.70 (s, 1H, H-vinil), 7.40-7.48 (m, 2H), 7.35 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 3.26 (m, 2H, NCH₂), 2.48-2.55 (m, 3xNCH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 0.96 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI m/z 457 [M^+].

Ejemplo 64

(2-pirrolidin-1-ilet)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-

138
140dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-Piridin-3-il-1,3-dihidroindol-2-ona (60 mg, 0.28 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (75 mg) para dar 90 mg (71%) del compuesto del título como un sólido naranja claro.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 11.05 (s, br, 1H, NH), 8.86 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.54 (dd, J = 1.5 & 4.8 Hz, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.91 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H, H-vinil), 7.44-7.53 (m, 2H), 7.36 (dd, J = 1.5 & 8.1 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 3.33 (m, 2H, NCH₂), 2.47-2.57 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.87 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 455 [M⁺].

Ejemplo 65(3-dimetilaminopropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-Piridin-3-il-1,3-dihidroindol-2-ona (42 mg, 0.2 mmol) con (3-dimetilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para dar 67 mg (75%) del compuesto del título como un sólido amarillo amarronado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 11.00 (s, br, 1H, NH), 8.86 (s, br, 1H), 8.54 (s, br, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.90 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H, H-vinil), 7.63 (m, 1H), 7.45-7.48 (m, 1H), 7.35 (dd, J = 1.7 & 8.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 3.21-3.27 (m, 2H, NCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.28 (m, 2H, NCH₂), 2.14 (s, 6H, 2xNCH₃), 1.64 (m, 2H, CH₂).

MS-EI *m/z* 443 [M⁺].

Ejemplo 66(3-dimetilaminopropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-

3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (67 mg, 0.32 mmol) con (3-dimetilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (81 mg) para dar 40 mg (28%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.66 (s, br, 1H, NH), 10.92 (s, br, 1H, NH), 8.14 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.44 (m, 3H), 7.32 (m, 1H), 6.95 (m, 1H), 3.33 (m, 2H, NCH₂), 2.43 (s, 6H, 2xCH₃), 2.27 (m, 2H, NCH₂), 2.13 (s, 6H, 2xNCH₃), 1.63 (m, 2H, CH₂).

MS-EI *m/z* 442 [M⁺].

Ejemplo 67**(3-dietilaminopropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó 5-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (1.5 g, 7.16 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2 g) para dar 1.3 g (40%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.64 (s, 1H, NH), 10.91 (s, 1H, NH), 8.14 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.8 (s, 1H, ArH), 7.7 (dd, *J* = 1.2 y 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.6 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, CONHCH₂), 7.4 (m, 3H, ArH), 7.3 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.9 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 3.2 (m, 2H, CONHCH₂), 2.5 (m, 12H, 3xNCH₂, 2xCH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.93 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 470 [M⁺].

Ejemplo 68**(3-dietilaminopropil)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó 6-Fenil-1,3-dihidroindol-2-ona (1.5 g, 7.16 mmol) con (3-

140
142

dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (2 g) para dar 1.9 g (57%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.58 (s, 1H, NH), 10.94 (s, 1H, NH), 7.8 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, *ArH*), 7.6 (m, 4H, *ArH*), 7.4 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, *ArH*), 7.3 (m, 2H), 7.1 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, *ArH*), 3.2 (m, 2H, CONHCH₂), 2.5 (m, 12H, 3xNCH₂, 2xCH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.93 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 470 [M⁺].

Ejemplo 69

(3-cloro-4-metoxifenil)amida del ácido 3-[4-(3-Dietilaminopropilcarbamoyl)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-ilmetil]-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-4-carboxílico

Se condensó (3-cloro-4-metoxifenil)amida del ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-4-carboxílico (1 g, 3.16 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (1 g, 3.58 mmol) para dar 1.7 g (85%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

MS-EI *m/z* 578.2 [M⁺].

Ejemplo 70

(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (0.5 g, 2.36 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (0.51 g) para dar 0.84 g del compuesto del título como un sólido rojo anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.61 (s, 1H, NH), 10.99 (s, 1H, NH), 8.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, *ArH*), 7.7 (m, 4H), 7.2 (dd, *J* = 1.8 y 8.3 Hz, 2H, *ArH*), 6.8 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, *ArH*), 3.3 (br s, 4H, 2xNCH₂), 3.2 (m, 2H, CONHCH₂), 2.6 (br s, 2H, NCH₂, 2xCH₃), 2.4 (s, 6H, 2xCH₃), 1.66 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.98 (t, *J* = 7.1 Hz,

147
143

6H, NCH_2CH_3).

MS-EI m/z 472 y 474 [$\text{M}^+ - 1$ y $\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 71

(2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (100 mg, 0.47 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico (150 mg) para dar 0.15 g (62%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.97 (s, 1H, NH), 10.95 (s, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, ArH), 7.84 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.23 (dd, $J = 1.3$ y 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, ArH), 3.5 (m, 1H, CH), 3.3 (m, 3H, CH y NHCH_2), 2.5 (br m, 6H, $3 \times \text{NCH}_2$), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.23 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 0.96 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$).

MS-EI m/z 514 y 516 [$\text{M}^+ - 1$ y $\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 72

(3-dietilamino-propil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (90 mg, 0.42 mmol) con (3-dietilaminopropil)amida del ácido 5-formil-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico (140 mg) para dar 54 mg (25%) del compuesto del título como un sólido rojo amarronado.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.98 (s, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 7.78 (s, 1H, H-vinil), 7.23 (dd, $J = 1.7$ y 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, ArH), 3.5 (m, 1H, CH), 3.25 (m, 2H, NHCH_2), 3.15 (m, 1H, CH),

2.7 (br s, 6H, 3xNCH₂), 1.7 (br m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, 2xCH₃), 1.24 (d, $J = 5.9$ Hz, 6H, 2xCH₃), 1.06 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

MS-EI m/z 528 y 530 [$M^+ - 1$ y $M^+ + 1$].

Ejemplo 73

(3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (130 mg, 0.6 mmol) con (3-pirrolidin-1-ilpropil)amida del ácido 5-formil-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico (150 mg, 0.45 mmol) para dar 36 mg (15%) del compuesto del título como un sólido tostado anaranjado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.98 (s, 1H, NH), 10.97 (s, 1H, NH), 8.10 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 7.78 (s, 1H, H-vinil), 7.23 (dd, $J = 1.6$ y 7.6 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, ArH), 3.5 (m, 1H, CH), 3.25 (m, 2H, NHCH₂), 3.15 (m, 1H, CH), 2.7 (br s, 6H, 3xNCH₂), 1.7 (br m, 6H, 3xNCH₂CH₂), 1.28 (d, $J = 5.6$ Hz, 6H, 2xCH₃), 1.24 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H, 2xCH₃).

MS-EI m/z 526 y 528 [$M^+ - 1$ y $M^+ + 1$].

Ejemplo 74

(piridin-4-ilmetil)-amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Bromo-1,3-dihidroindol-2-ona (170 mg, 0.8 mmol) con (piridin-4-ilmetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (200 mg) para dar 14 mg (4%) del compuesto del título como sólido amarillo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.67 (s, 1H, NH), 11.01 (s, br, 1H, NH), 8.51 (dd, $J = 1.6$ & 4.3 Hz, 2H), 8.23 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, CONHCH₂), 8.11 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H, H-vinil), 7.31 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 7.25 (dd, $J = 1.9$ & 8.1

143
145

Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, NCH_2), 2.46 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$).

MS-EI m/z 450 y 452 [$\text{M}^+ - 1$ y $\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 75

(2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-[6-(4-Butilfenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-[6-(4-Butilfenil)]-1,3-dihidroindol-2-ona (50 mg, 0.19 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para dar 74 mg (76%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

^1H NMR (360 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.58 (s, 1H, NH), 10.93 (s, br, 1H, NH), 7.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H, H-vinil), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.46 (m, 1H, CONH), 7.26 (m, 3H), 7.09 (s, 1H), 3.30 (m, 2H, CH_2), 2.52-2.63 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.49 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 1.68 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.58 (m, 2H, CH_2), 1.34 (m, 2H, CH_2), 0.91 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3).

MS-EI m/z 510 [M^+].

Ejemplo 76

(2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-[6-(5-Isopropil-2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(5-Isopropil-2-metoxifenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (50 mg, 0.17 mmol) con (2-pirrolidin-1-il-etil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (45 mg) para dar 67 mg (75%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

^1H NMR (360 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.60 (s, 1H, NH), 10.82 (s, br, 1H, NH), 7.77 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.61 (s, 1H, H-vinil), 7.45 (m, 1H, CONH), 7.0-7.19 (m,

144
146

5H), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (m, 2H, CH₂), 2.87 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.56 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 4H, 2xCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.68 (m, 4H, 2xCH₂), 1.21 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS *m/z* 527.2 [M⁺+1].

Ejemplo 77

(2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-[6-(4-Etilfenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(4-Etilfenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (45 mg, 0.19 mmol) (2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para dar 60 mg (65%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.59 (s, 1H, NH), 10.96 (s, br, 1H, NH), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H, H-vinil), 7.51-7.56 (m, 3H), 7.25-7.30 (m, 3H), 7.08 (d, *J* = 1 Hz, 1H), 3.31 (m, 2H, CH₂), 2.63 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.55 (m, 2H, CH₂), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂), 1.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 482 [M⁺].

Ejemplo 78

(2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-[6-(2,4-Dimetoxifenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(2,4-Dimetoxifenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (51 mg, 0.19 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para dar 30 mg (31%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.59 (s, 1H, NH), 10.86 (s, br, 1H, NH),

125
147

7.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.60 (s, 1H, H-vinil), 7.49 (m, 1H, CONH), 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.03 (m, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.58-6.65 (m, 2H), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.33 (m, 2H, CH₂), 2.55 (m, 2H, CH₂), 2.50 (m, 4H, 2xCH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 514 [M⁺].

Ejemplo 79

(2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-[6-(3-isopropilfenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 6-(3-isopropilfenil)-1,3-dihidroindol-2-ona (48 mg, 0.19 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para dar 59 mg (63%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.83 (s, 1H, NH), 10.97 (s, br, 1H, NH), 7.87 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.68 (s, 1H, H-vinil), 7.24-7.55 (m, 6H), 7.13 (s, 1H), 3.34 (m, 2H, CH₂), 3.30 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.60 (m, 2H, CH₂), 2.50 (m, 4H, 2xCH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 4H, 2xCH₂), 1.27 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 496 [M⁺].

Ejemplo 80

(2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-fluoro-1,3-dihidroindol-2-ona (0.54 g, 3.8 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para dar 0.83 g (55%) del compuesto del título como un sólido amarillo verdoso.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.66 (s, 1H, NH), 10.83 (s, br, 1H, NH),

146
188

7.73 (dd, $J = 2.5$ & 9.4 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H, H-vinil), 7.37 (t, 1H, CONHCH₂CH₂), 6.91 (m, 1H), 6.81-6.85 (m, 1H), 3.27 (m, 2H, CH₂), 2.51 (m, 6H, 3xCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 0.96 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 398 [M⁺].

Ejemplo 81

Ácido 3-[4-(2-Dietilaminoetilcarbamoyl)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetil]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico

Se condensó ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico (80 mg, 0.45 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para dar 210 mg (92%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.6 (s, 1H, NH), 7.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.66 (s, 1H, H-vinil), 7.57 (dd, $J = 1.5$ & 8.0 Hz, 1H), 7.40-7.42 (m, 2H), 3.28 (m, 2H, CH₂), 2.88 (m, H-piperidin), 2.54 (m, 6H, 3xCH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.56 (m, H-piperidine), 0.97 (t, $J = 6.98$ Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 424 [M⁺].

Ejemplo 82

(2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-(5-Dimetilsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó dimetilamida del ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico (90 mg, 0.36 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para dar 100 mg (54%) del compuesto del título como sólido amarillo.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.65 (s, 1H, NH), 11.30 (s, br, 1H, NH), 8.25 (d, 1H), 7.92 (s, 1H, H-vinil), 7.48-7.53 (m, 2H), 7.07 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.33

147
149

(m, 2H, CH₂), 2.61 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.56 (t, 2H, CH₂), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 485 [M⁺].

Ejemplo 83

(2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-[5-(3-clorofenilsulfamoi)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó (3-cloro-fenil)amida del ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1H-Indol-5-sulfónico (120 mg, 0.38 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para dar 150 mg (69%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.55 (s, 1H, NH), 11.26 (br s, 1H, NH), 10.30 (br s, 1H, NH), 8.26 (d, 1H), 7.79 (s, 1H, H-vinil), 7.51-7.57 (m, 2H), 7.22 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.07 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.44 (m, 2H, CH₂), 2.57 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.68 (m, 4H, 2xCH₂).

MS *m/z* 568 [M⁺].

Ejemplo 84

(2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 2,4-Dimetil-5-[2-oxo-5-(piridin-3-ilsulfamoi)-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó Piridin-3-ilamida del ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico (110 mg, 0.38 mmol) con (2-pirrolidin-1-iletí)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para dar 150 mg (74%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.58 (s, 1H, NH), 8.21 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 8.04 (m, 1H), 7.76 (s, 1H, H-vinil), 7.49-7.54 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.14 (m, 1H),

148
150

6.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.33 (m, 2H, CH_2), 2.56 (t, $J = 7.06$ Hz, 2H, CH_2), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.43 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1.68 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

MS m/z 535 [M^+].

Ejemplo 85

3-[3,5-Dimetil-4-(4-metilpiperazin-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetilen]-4-(2-hidroxi-etil)-1,3-dihidroindol-2-ona

Se condensó 4-(2-Hidroxi-etil)-1,3-dihidroindol-2-ona (71 mg, 0.4 mmol) con 3,5-dimetil-4-(4-metil-piperazin-1-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído para dar 90 mg (55%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 14.25 (s, 1H, NH), 10.88 (s, 1H, NH), 7.57 (s, 1H, H-vinil), 7.03 (m, 1H), 6.75-6.82 (m, 2H), 4.86 (m, 1H, OH), 3.70 (m, 2H, CH_2), 3.04 (m, 2H, CH_2), 2.48 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.28 (br s, 7H), 2.19 (s, 3H, CH_3), 2.18 (s, 3H, CH_3).

MS m/z (+ve) 409.3 [M^+].

Ejemplo 86

Fenilamida del ácido 3-[3,5-Dimetil-4-(4-metilpiperazin-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetilen]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico

Se condensó fenilamida del ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico (110 mg, 0.4 mmol) con 3,5-dimetil-4-(4-metilpiperazin-1-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldehído (100 mg) para dar 50 mg (24%) del compuesto del título como sólido amarillo.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.52 (s, 1H, NH), 11.26 (s, 1H, NH), 10.08 (s, 1H, NH), 8.21 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.75 (s, 1H, H-vinil), 7.50 (dd, $J = 1.6$ & 8.3 Hz, 1H), 7.19 (m, 2H), 7.10 (m, 2H), 6.97 (m, 2H), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.28 (m, 10H, $2\times\text{CH}_3$ & $2\times\text{CH}_2$), 2.18 (s, 3H, CH_3).

143
151MS-EI m/z 519 [M^+].**Ejemplo 87****(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(5-Dimetilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó Dimetilamida del ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico (90 mg, 0.38 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para dar 80 mg (43%) del compuesto del título como sólido amarillo.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (s, 1H, NH), 8.27 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H, H-vinil), 7.49 (dd, J = 1.7 & 8.0 Hz, 1H), 7.44 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7.07 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.26 (m, 2H, CH₂), 2.60 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.53 (m, 2H, CH₂), 2.45-2.50 (m, 10H, 2xCH₃ & N(CH₂CH₃)₂), 0.96 (t, J = 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 487 [M^+].**Ejemplo 88****(2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-[5-(3-Clorofenilsulfamoil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Se condensó (3-cloro-fenil)amida del ácido 2-Oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico (120 mg, 3.8 mmol) con (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para dar 80 mg (37%) del compuesto del título como sólido amarillo.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.55 (s, 1H, NH), 11.24 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, NH), 8.25 (d, J = 1.87 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H, H-vinil), 7.52 (dd, J = 1.87 & 8.3 Hz, 1H), 7.42 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7.22 (t, J = 8.02 Hz, 1H), 7.15 (t, J = 2 Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.27 (m, 2H, CH₂), 2.48-2.57 (m, 6H, 3xCH₂), 2.45

150
152

(s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 570.1 [M⁺].

Ejemplo 95

Etiléster del ácido 3-(2-Oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.74 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH), 8.13 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H-vinil), 7.70 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.49 (dd, $J = 1.7$ & 8.0 Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.32 (m, 1H), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.26 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.79 (m, 2H, CH₂), 2.72 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂), 1.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 412 [M⁺].

Ejemplo 99

Etiléster del ácido 3-(2-Oxo-5-fenilsulfamoil-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.84 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 10.07 (s, 1H, NH), 8.24 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H-vinil), 7.57 (dd, $J = 1.8$ & 8.0 Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.27 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.80 (m, 2H, CH₂), 2.73 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂), 1.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 491 [M⁺].

Ejemplo 109

Ácido 3-[3-(Morfolin-4-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetilen]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.60 (s, 1H, NH), 12.75 (br s, 1H, COOH), 11.08 (s, 1H, NH), 7.85 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H, H-vinil), 7.62 (dd, $J = 1.4$ &

151
153

7.8 Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 3.65 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3.55 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.81 (m, 2H, CH_2), 2.54 (m, 2H, CH_2), 1.73 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$).

MS-EI m/z 421 [M^+].

Ejemplo 112

5-Bromo-3-[3-(pirrolidin-1-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetil]-1,3-dihidro-indol-2-ona

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.56 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH), 8.05 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H-vinil), 7.28 (dd, $J = 1.3$ & 8.3 Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.57 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.79 (m, 2H, CH_2), 2.65 (m, 2H, CH_2), 1.88 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.71 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$).

MS-EI m/z 439 & 441 [$\text{M}^+ - 1$] & [$\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 114

Ácido 3-(3-Dimetilcarbamoil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetil)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.60 (s, 1H, NH), 12.72 (br s, 1H, COOH), 11.05 (s, 1H, NH), 7.85 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H, H-vinil), 7.62 (dd, $J = 1.3$ & 7.9 Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 3.03 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.81 (m, 2H, CH_2), 2.55 (m, 2H, CH_2), 1.73 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$).

MS-EI m/z 379 [M^+].

Ejemplo 115

Ácido 4-Metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-iliden-metil)-1H-pirrol-3-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.56 (br s, 1H, NH), 8.24 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H, H-vinil), 7.74 (d, $J = 2.96$ Hz, 1H), 7.56 (dd, $J = 1.5$ & 8.1 Hz, 1H), 7.20 (br m, 1H, NHCH_3), 7.03 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H,

152
15A

CH₃).

MS-EI m/z 361 [M⁺].

Ejemplo 116

Etiléster del ácido {[4-Metil-5-(4-metil-5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético

Se efectuó una formilación a 4-Metil-1H-pirrol-3-carboxílico etiléster del ácido (lit. ref. D.O. Cheng, T. L. Bowman y E. LeGoff, J. Heterocyclic Chem.; 1976; 13; 1145-1147) usando el método A, se hidrolizó usando el método B seguido por amidaion (método C) para dar etiléster del ácido [(5-formil-4-metil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético.

4-Metil-5-metilaminosulfonil-2-oxindol (50 mg, 0.21 mmol) se condensó con etiléster del ácido [(5-formil-4-metil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético (100 mg, 0.42 mmol) y piperidín (0.1 mL) en etanol (2 mL) para dar 50 mg (52%) del compuesto del título.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.59 (s, 1H, NH), 11.29 (v.br. s, 1H, NH-CO), 8.33 (t, J = 5.8 Hz, 1H, CONHCH₂), 7.83 (d, J = 3.11 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H, H-vinil), 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.34 (br m, 1H, NHCH₃), 6.89 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.11 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.92 (d, J = 5.8 Hz, 2H, GlyCH₂), 2.88 (s, 3H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.42 (d, J = 4.71 Hz, 3H, HNCH₃), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 460 [M⁺].

Ejemplo 117

Etiléster del ácido {[4-Metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético

Una mezcla de 5-metilaminosulfonil-2-oxindol (0.06 g, 0.22 mmol), etiléster

153
155

del ácido [(5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético (0.075 g, 0.27 mmol) y piperidina (2 gotas) en etanol (5 mL) se calentó en un tubo sellado a 90° C durante 12 hrs. Después de enfriarlo, se recolectó el precipitado por filtración al vacío, se lavó con etanol, se trituró con diclorometano/éter y se secó para dar 0.035 g (36%) del compuesto del título como un sólido amarillento amarronado.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.6 (s, 1H, NH), 11 (v.br. s, 1H, NH-CO), 8.30 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CONHCH₂), 8.25 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H, H-vinil), 7.84 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 1.9 & 8.5 Hz, 1H), 7.14 (br m, 1H, NHCH₂), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.11 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.92 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, GlyCH₂), 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.41 (m, 3H, NCH₂), 1.20 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS *m/z* 446 [M⁺].

Ejemplo 118

Ácido [(4-Metil-5-(5-metilsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-iliden-metil)-1*H*-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético

Una mezcla de etiléster del ácido [(5-formil-4-metil-1*H*-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético (0.142 g, 0.59 mmol) y NaOH 1N (1.2 mL) en metanol (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hr. La reacción se concentró y el residuo se condensó con 5-metilaminosulfonil-2-oxindol (0.13 g, 0.48 mmol) y piperidin (0.12 mL) en etanol (12 mL) para dar 0.11 g (52%) del compuesto del título.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.98 (br s, 1H, NH), 8.17 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 2 & 8.2 Hz, 1H), 7.21 (m on br s, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.41 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, CH₂NH), 2.54 (s, 3H, pirrol-CH₃), 2.39 (s, 3H, ArCH₃).

MS *m/z* 417 [M-1]⁺.

Ejemplo 120**Ácido 5-Metil-2-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico**

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.77 (br s, 1H, NH), 12.49 (s, 1H, COOH), 11.07 (s, 1H, NH), 8.39 (s, 1H, H-vinil), 7.43 (d, J = 7.47 Hz, 1H), 7.20 (t, J = 7.47 Hz, 1H), 7.03 (t, J = 7.47 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 7.47 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 1.53 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H, CH₃).

MS m/z 269 [M+H]⁺.

Ejemplo 121**Etiléster del ácido 5-Metil-2-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-iliden-metil)-1H-pirrol-3-carboxílico**

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.79 (s, 1H, NH), 11.08 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H-vinil), 7.45 (d, J = 7.52 Hz, 1H), 7.20 (t, J = 7.52 Hz, 1H), 7.03 (t, J = 7.52 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 7.52 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.28 (q, J = 7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 1.32 (t, J = 7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS m/z 297.1 [M+H]⁺.

Ejemplo 122**Etiléster del ácido 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico**

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.72 (s, 1H, NH), 11.16 (s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, H-vinil), 7.53 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 2.0 & 8.05 Hz, 1H), 6.87 (t, J = 8.05 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.28 (q, J = 7.03 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.33 (t, J = 7.03 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS m/z 375 & 377 [M+H]⁺.

Ejemplo 123**Ácido 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-iliden-metil)-5-metil-1H-pirrol-3-**

155
157carboxílico

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.72 (s, 1H, NH), 12.57 (s, 1H, COOH), 11.19 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H-vinil), 7.51 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 1.4$ & 8.17 Hz, 1H), 6.87 (t, $J = 8.17$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.35 (s, 3H, CH_3).

MS m/z 347 & 349 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 124(2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenemetil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

A una solución de ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (250 mg, 1.63 mmol) en dimetilformamida (3 mL) se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (376 mg, 1.2 equiv.), 1-hidroxibenzotriazol (265 mg, 1.2 equiv.), trietilamina (0.45 mL, 2 equiv.) y 1-(2-aminoetil)pirrolidina (0.23 mL, 1.1 equiv.). Después de agitarlo a temperatura ambiente durante la noche, la reacción se diluyó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera (con sal extra) y se extrajo con 10% metanol en diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar 130 mg de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico.

Una mezcla de 5-bromo-2-oxindol (106 mg, 0.5 mmol), (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (125 mg, 1 equiv.) y piperidin (0.2 mL) en etanol (2 mL) se calentó en un tubo sellado a 80°C durante 1 h. y luego se enfrió. El precipitado que se formó se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y acetato de etilo y se secó para dar el compuesto del título como un sólido anaranjado.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, 1H, NH), 11.06 (br s, 1H, NH),

156
158

8.56 (s, 1H, H-vinil), 8.15 (m, 1H, CONHCH₂), 7.48 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 1.8$ & 7.9 Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.35 (m, 2H, HNCH₂CH₂), 2.56 (t, $J = 6.91$ Hz, 2H, HNCH₂CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS m/z 443/ 445 [M^+ y $M^+ + 2$].

Ejemplo 125

(2-dietilaminoetil)-amida del ácido 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-iliden-metil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

A una solución de ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (320 mg, 2.1 mmol) en dimetilformamida (3 mL) se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (483 mg, 1.2 equiv.), 1-hidroxibenzotriazol (340 mg, 1.2 equiv.), trietilamina (0.59 mL, 2 equiv.) y N,N-dietiletlen-diamina (0.32 mL, 1.1 equiv.). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la reacción se diluyó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera (con sal extra) y se extrajo con 10% metanol en diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar (2-dietilaminoetil)-amida del ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico.

Una mezcla de 5-bromo-2-oxindol (106 mg, 0.5 mmol), (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (126 mg, 1 equiv.) y piperidina (0.2 mL) en etanol (2 mL) se calentó en un tubo sellado a 80°C durante 1 h y luego se enfrió. Se recolectó el precipitado por filtración al vacío, se lavó con etanol y acetato de etilo y se secó para dar el compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.62 (s, 1H, NH), 11.11 (br s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, H-vinil), 8.1 (m, 1H, CONHCH₂), 7.49 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J =$

15F
159

2.2 & 8.3 Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 2.24$ Hz, 1H), 3.31 (m, 2H, HNCH_2CH_2), 2.59 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 2.36 (s, 3H, CH_3), 0.99 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 445/ 447 [M^+ y $\text{M}^+ + 2$].

Ejemplo 126

(2-dietilamino-etil)-amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Una mezcla de 1,3-dihidro-indol-2-ona (266 mg, 2 mmol), (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (530 mg, 2 mmol) y piperidin (1 gota) en etanol se calentó a 90°C durante 2 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, el precipitado resultante se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para dar 422 mg (55%) del compuesto del título como un sólido amarillo claro.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.7 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H, H-vinil), 7.41 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, NH), 7.13 (dt, $J = 1.2$ & 7.6 Hz, 1H), 6.99 (dt, $J = 1.2$ & 7.6 Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.28 (m, 2H), 2.48-2.55 (m, 6H), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 0.97 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS + ve APCI 381 [$\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 127

(2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Una mezcla de 5-Cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona (335 mg, 2 mmol), (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (530 mg, 2 mmol) y piperidina (1 gota) en etanol se calentó a 90°C durante 2 horas. La reacción se

158
160

enfrió a temperatura ambiente, el precipitado resultante se recolectó por filtración al vacío, se lavó con etanol y se secó para dar 565 mg (68%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.65 (s, 1H, NH), 11.0 (s, 1H, NH), 7.98 (d, J = 2.1 Hz, 1H) 7.77 (s, 1H H-vinil), 7.44 (t, NH), 7.13 (dd, J = 2,1 & 8.4 Hz, 1H) 6.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.28 (g, 2H), 2.48-2.53 (m, 6H), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 0.97 (t, J = 7.0 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)

MS + ve APCI 415 [$\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 128

(2-pirrolidin-1-etil)-amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 1,3-Dihidro-indol-2-ona con (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para dar el compuesto del título.

MS + ve APCI 379 [$\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 129

(2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona con (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para dar el compuesto del título.

MS + ve APCI 397 [$\text{M}^+ + 1$].

Ejemplo 130

(2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona con (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para dar el compuesto del título.

150
161

MS + ve APCI 413 [$M^+ + 1$].

Ejemplo 131

(2-dimetilaminoetil)-amida del ácido 2,4-Dimetil-5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 1,3-Dihidro-indol-2-ona con (2-dimetilaminoetil) amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para dar el compuesto del título.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.63 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH), 7.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H H-vinil), 7.48 (t, 1H, NH), 7.13 (dt, 1H), 6.98 (dt, 1H), 6.88 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.31 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 2.38 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.19 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)

MS + ve APCI 353 [$M^+ + 1$].

Ejemplo 132

(2-dimetilaminoetil)-amida del ácido 5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se condensó 5-Fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona con (2-dimetilaminoetil)amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para dar el compuesto del título.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.68 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH), 7.76 (dd, $J = 2.4$ & 9.4 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H H-vinil), 7.51 (t, 1H, NH), 6.93 (m, 1H), 6.84 (dd, $J = 4.6$ & 8.4 Hz, 1H), 3.31 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.38 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.19 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)

MS + ve APCI 371 [$M^+ + 1$].

Ejemplo 133

(2-etilamino-etil)-amida del ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

(2-etilamino-etil)-amida de ácido 5-Formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-



carboxílico (99 g), etanol (400 mL), 5-fluoro-2-oxindol (32 g) y pirrolidina (1.5 g) se sometieron a reflujo durante 3 horas con agitación. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y los sólidos se recolectaron por filtración al vacío. Los sólidos se agitaron en etanol a 60 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se recolectaron por filtración al vacío. El producto se secó bajo vacío para dar (2-etilamino-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (75 g, 95 % de rendimiento). ¹H-NMR (dimetilsulfóxido-*d*₆) δ 1.03 (t, 3H, CH₃), 2.42, 2.44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.56 (q, 2H, CH₂), 2.70, 3.30 (2xt, 4H, 2xCH₂), 6.85, 6.92, 7.58, 7.72, 7.76 (5xm, 5H, aromático, vinilo y CONH), 10.90 (br s, 1H, CONH), 13.65 (br s, 1H, pirrol NH). MS *m/z* 369 [M-1].

Ejemplo 196

(2-dietil-N-oxoamino-etil)-amida del ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico

Método A:

(2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (598 mg) y diclorometano (60 mL) en un baño de hielo se trataron con ácido 3-cloroperbenzoico (336 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se evaporó rotativamente y el residuo se suspendió en metanol (20 mL). Se añadió agua (20 mL) con contenido de hidróxido de sodio (240 mg) y la mezcla se agitó durante una hora. El precipitado se recolectó por filtración al vacío, se lavó con 5 mL de agua y se secó bajo vacío para dar (2-dietil-N-oxoamino-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (510 mg, 82 % de rendimiento) como un sólido anaranjado. ¹H-NMR

165
163

(DMSO- d_6) δ 13.72 (br s, 1H, NH), 11.02 (br s, 1H, CONH), 9.81 (br s, 1H, CONH), 7.75 (dd, 1H, aromático), 7.70 (s, 1H, aromático), 6.93 (td, 1H, aromático), 6.84 (m, 1H, aromático), 3.63 (m, 2H, CH₂), 3.29 (m, 2H, CH₂), 3.14 (m, 4H, 2xCH₂), 2.47 (s, 1H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 1.64 (t, 6H, 2xCH₃). MS m/z 415 [M+1].

Método B:

Se suspendió (2-dietilamino-etil)-amida de ácido 5-Formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (10 g) en diclorometano (100 mL) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió ácido 3-Cloro-paroxibenzoico (13.1 g) con agitación y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y luego se agitó durante la noche. La mezcla se evaporó rotativamente a sequedad y se cromatografió sobre una columna de sílica gel eluyendo con 20 % metanol en diclorometano. Se combinaron las fracciones con contenido de producto y se evaporaron en forma rotativa a sequedad para dar (2-dietil-N-oxoamino-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (9 g, 83 % de rendimiento).

(2-dietil-N-oxoamino-etil)-amida del ácido 5-Formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (9 g), 5-fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona (9 g, 83 % de rendimiento), y pirrolidina ((9 g, 83 % de rendimiento (0.1 g) se sometieron a reflujo en etanol (30 mL) durante 4 horas. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y el precipitado se recogió por filtración al vacío y se lavó con etanol. Los sólidos se agitaron en acetato de etilo (30 mL), se recogieron por filtración al vacío, se lavó con acetato de etilo y se secó bajo vacío para dar (2-dietil-N-oxoamino-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (10.3 g 80 % de rendimiento) como un sólido naranja. ¹H-NMR (DMSO- d_6) δ 13.72 (br s, 1H, NH), 11.02 (br s, 1H, CONH), 9.81 (br s, 1H,

V62
164

CONH), 7.75 (dd, 1H, aromático), 7.70 (s, 1H, aromático), 6.93 (td, 1H, aromático), 6.84 (m, 1H, aromático), 3.63 (m, 2H, CH₂), 3.29 (m, 2H, CH₂), 3.14 (m, 4H, 2xCH₂), 2.47 (s, 1H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 1.64 (t, 6H, 2xCH₃). MS *m/z* 415 [M+1].

Ejemplo 190

[2-(piridin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se agitó ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (120 mg, 0.4 mmol) con EDC, HCl (96 mg, 0.5 mmol), 1-hidroxibenzotriazol anhidro (68 mg, 0.5 mmol), y 2-2-aminoetilpiridina adquirida a Aldrich en DMF anhidra (3 mL) durante 2-3 días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con NaHCO₃ 1M (1.5 ml), luego con 8 ml de agua. El producto crudo precipitado se recolectó por filtración, se lavó con agua, se secó y se purificó por cristalización o cromatografía para dar [2-(piridin-1-il)-etil]amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Ejemplo 189

[2-(piridin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Procediendo como se describe en el ejemplo anterior, pero sustituyendo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico con ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (127 mg) se obtuvo [2-(piridin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

163
165**Ejemplo 192****[2-(piridin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Procediendo como se describe en el Ejemplo 190 precedente pero sustituyendo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico con ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (145 mg) se obtuvo [2-(piridin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

Ejemplo 191**2-(piridin-1-il)etil]amida del ácido 5-[2-Oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Procediendo como se describe en el Ejemplo 190 precedente pero sustituyendo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidene-metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico con ácido 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (113 mg) se obtuvo [2-(piridin-1-il)etil]amida del ácido 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Ejemplo 203**[2-(piridin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-Ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico**

Procediendo como se describe en el Ejemplo 190 precedente pero sustituyendo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-Indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico con ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (123 mg) se obtuvo [2-(piridin-1-

16A
166

II)etil]amida del ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Ejemplos 142, 186, 187, 188 y 204

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con 1-(2-aminoetil)pirrolidina, adquirida a Aldrich Chemical Company, Inc. se obtuvieron los compuestos deseados.

Ejemplos 143-147

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con 1-(2-aminoetil)imidazolin-2-ona (preparada calentando carbonato de dimetilo con bis(2-aminoetil) amina (2 equivalentes) en un recipiente sellado, hasta 150 °C durante 30 min., siguiendo el procedimiento descrito en la Patente de los EE.UU. N° 2813212 (1950), adjudicada a Rohm & Haas Co. El producto crudo se purificó sobre sílica-gel utilizando una mezcla de eluyentes: cloroform-metanol-amoniaco en solución acuosa 80:25:2) proveyó los compuestos deseados.

Ejemplos 148-151 y 184

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes, pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con etiléster del ácido 4-(2-aminoetil)piperazina-1-acético (preparado como sigue:: se trató etiléster del ácido piperazin-1-acético (11.22 g) con yodoacetónitrilo (5.0 mL) en presencia de carbonato de potasio (8.9 g) en acetato de etilo (260 mL) a 0 °C. Luego que se hubo completado el agregado de yodoacetónitrilo (45 min), la mezcla de reacción fue agitada a continuación a temperatura ambiente durante 11 horas. La mezcla de reacción se filtró y los filtrados se evaporaron. El residuo se hidrogenó en

165
167

presencia de boruro de cobalto (preparado a partir de CoCl_2 y borhidruro de sodio) a temperatura ambiente a 50 psi durante 2 días en etanol. Por filtración, evaporación y purificación cromatográfica utilizando una mezcla de eluyentes cloroformo-metanol-amoníaco acuoso 80:25:2 se obtuvo la amina deseada (3.308 g) como un aceite amarillo pálido) proveyó los compuestos deseados.

Ejemplo 152-153

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con 2-[(2-aminoetilamino)]acetonitrilo preparado como sigue: una solución de yodoacetonitrilo (50 mmol) en alcohol etílico (80 ml) se añadió a una solución de etilendiamina (150 ml) en alcohol etílico (80 ml) a 0 °C a lo largo de 30 minutos. La agitación continuó durante 1 hr a 0 °C, luego a temperatura ambiente durante 14 horas. Se agregó 55 mmol de carbonato de potasio, se agitó durante 30 minutos, se filtró y el filtrado se concentró a temperatura ambiente. El residuo se purificó sobre sílice utilizando una mezcla de eluyentes cloroformo-metanol-amoníaco acuoso 80:15:1.5 para dar 2-[(2-aminoetilamino)]-acetonitrilo (3.550 g) que se utilizó inmediatamente) proveyó los compuestos deseados.

Ejemplo 154-158

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con 1-(3-aminopropil)-azepin-2-ona (preparada de acuerdo al procedimiento de Kraft A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14, excepto que la hidrólisis de DBU se realizó a 145 °C netos en presencia de hidróxido de litio (1 hr, 5 ml de DBU, 2 ml de agua, 420 mg de hidróxido de litio hidratado). La purificación del producto crudo sobre sílice utilizando una mezcla de eluyentes cloroformo-metanol-amoníaco acuoso

166
168

80:40:4 provided 1-(3-aminopropil)azepin-2-ona (4.973g, 87 % de rendimiento))
proveyó los compuestos deseados.

Ejemplos 133-135, 159 y 200

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con N-acetiletilendiamina, (preparada calentando una mezcla de acetato de etilo con etilendiamina (1.5 equivalentes) a 160 °C durante 1 hr en un recipiente sellado. La destilación al vacío proveyó el producto deseado en 56% de rendimiento. La N-acetiletilendiamina también está disponible en Aldrich) proveyó los compuestos deseados.

Ejemplos 148-140

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con 1-(3-aminopropil)-tetrahydro-pirimidin-2-ona (preparada de la misma manera que 1-(3-aminopropil)-azepin-2-ona de acuerdo al procedimiento en Kraft A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14: Brevemente, se calientan 1,3,4,6,7,8-hexahidro-2H-pirimido[1,2-a]pirimidina (4.939 g), hidróxido de litio hidratado (918 mg) y 2 ml de agua sin un solvente en un recipiente sellado a 145 °C durante 1hr. El producto crudo se purificó sobre una columna de silica-gel en cloroformo-metanol-amoníaco acuoso 80:40:4 para dar amina pura (5.265g, 94% de rendimiento).

Ejemplos 141, 160-162 y 185

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con 1-(2-aminoetil)-piperazina-2-ona (preparada como sigue: se agregó por goteo cloruro de tert-butildifenilsililo (25 mL, 97.7 mmol) en una solución de DBU (19.5 ml, 130 mmol)

y bis(2-aminoetil)amina (4.32 mL, 40 mmol) en dimetilacetamida anhidra (80 mL) a temperatura ambiente después de enfriar sobre baño de agua bath dentro de los 5 minutos. La mezcla se agitó durante 5 horas. Bromoacetic ácido etilo ester (6.70 mL, 60 mmol) se añadió neat upon cooling to temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 25 minutos, luego se evaporó en alto vacío. El residuo se disolvió en metanol (200 ml), se agregaron KHCO_3 (10g) y KF (12 g, 200 mmol) y la mezcla se agitó a 80 °C durante 5 horas. Se agregó 10g de Na_2CO_3 , se agitó durante 10 minutos, se enfrió y se filtró. Los filtrados se evaporaron. El residuo se extrajo con hexanos (2 veces 250 ml). El material insoluble en hexanos se disolvió en etanol (80ml), se filtró y se evaporó. El residuo se purificó sobre una columna de silica-gel en cloroformo-metanol-amoniaco acuoso 80:40:4 para dar amina pura (4.245g, 74% de rendimiento)) proveyó los compuestos deseados.

Ejemplos 163-167

Procediendo como se describe en los Ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 precedentes pero sustituyendo 2-(2-aminoetil)piridina con 3-[(2-aminoetil)amino]propionitrilo (preparado a partir de etilendiamina (150 mmol) y acrilonitrilo (50 mmol) en THF a temperatura ambiente, como se describe en Israel, M. et al: J. Med Chem. 7, 1964, 710-16., proveyó la amina deseada (4.294 g)) proveyó los compuestos deseados.

Ejemplo 168

[2-(4-metilpiperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

A una mezcla de lodos amarillos en agitación de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (90 mg), DMF (0.8 mL) y TEA (0.084 mL) en un tubo de reacción de 20 mL, se añadió

168
170

reactivo BOP (199 mg). La mezcla se tornó clara en 5 min. Se agregó 2-(4-metilpiperazin-1-il)etilamina¹ (51 mg) en la mezcla clara. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Productos sólidos amarillos precipitaron del sistema de reacción. La cromatografía en capa fina (10% metanol en cloruro de metileno) mostró que todo el material de inicio había sido convertido en el producto. El sólido se aisló por filtración al vacío y se lavó una vez con etanol (1 mL). El sólido fue sonicado en dietiléter (2 mL) durante 20 min y se recolectaron por filtración al vacío. Luego de secar al vacío se obtuvo, (4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (79 mg, 62% de rendimiento). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.40, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2.41 (m, 2H, CH₂), 2.47 (m, 8H, 4xCH₂), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.82 (dd, J=4.5, 8.7Hz, 1H), 6.91 (td, ²J=2.4, ³J=8.8Hz, 1H), 7.43 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.75 (dd, J=2.8, 9.6Hz, 1H) (aromático y vinílico), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.67 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 424.4 (M-1).

Ejemplo 169

(4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 168 precedente pero sustituyendo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico con ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (95 mg, 0.3 mmol) se obtuvo (4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (76 mg, 58%).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.41, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2.42

169
171

(m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 8H, 4xCH₂), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.84 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.11 (dd, J=2.0, 8.0Hz, 1H), 7.44 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.97 (d, J=2.0Hz, 1H) (aromático y vinílico), 10.98 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 440.2 (M-1).

Ejemplo 170

(4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 168, pero sustituyendo ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico con ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico se obtuvo (4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (39 mg, 54%) de SU011670 (54 mg, 0.15 mmol).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.41, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2.42 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 8H, 4xCH₂), 3.31 (m, 2H, CH₂), 6.80 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.23 (dd, J=2.0, 8.0Hz, 1H), 7.44 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.09 (d, J=2.0Hz, 1H) (aromático y vinílico), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.61 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 486.6 (M).

Ejemplo 172

(4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(2-Oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 168 precedente pero sustituyendo ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico SU014900 con ácido 5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico se obtuvo (4-metilpiperazin-1-il-

170
172

etil)-amida del ácido 5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenemetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico, SU014903 (136 mg, 84%) de SU012120 (112.8 mg, 0.4 mmol).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.39, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2.42 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 8H, 4xCH₂), 3.30 (t, 2H, CH₂), 6.86 (d, J=8.0Hz, 1H), 6.96 (t, J=7.4 Hz, 1H), 7.10 (t, J=7.8Hz, 1H), 7.41 (t, J=5.4Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.76 (d, J=7.6Hz, 1H) (aromático y vinílico), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.61 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 406.6 (M-1).

Ejemplo 171

[2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etil]amida del ácido 5-[2-Oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

A una mezcla de lodos amarillos en agitación de ácido 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (112.8 mg, 0.4 mmol), DMF (0.5 mL) y trietilamina (0.111 mL) en un tubo de reacción de 20 mL, se añadió reactivo BOP (265 mg). La mezcla se tornó clara en 5 min. Se agregó 2-(2,6-dimetilpiperazin-1-il)etilamina (68.6 mg) (véase, Tapia, L. Alonso-Cires, P. Lopez-Tudanca, R. Mosquera, L. Labeaga, A. Innerariti, A. Orjales, J. Med. Chem., 1999, 42, 2870-2880) sobre la mezcla clara. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente hasta el día siguiente. La cromatografía en capa fina (10% metanol en cloruro de metileno) mostró que todo el material de inicio se había convertido en producto. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y luego se purificó por cromatografía flash (CH₂Cl₂/CH₃OH=20/1-15/1) seguida de recristalización, para dar 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico ácido [2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etil]amida (83 mg, 50% de rendimiento).

173

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.15, 1.16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.95 (t, J=11.6Hz, 2H, CH₂), 2.41, 2.47 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 2H, CH₂), 3.03 (d, J=10Hz, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.86 (d, J=8.0Hz, 1H), 6.97 (t, J=7.2 Hz, 1H), 7.11 (t, J=7.8Hz, 1H), 7.48 (t, J=5.6 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.75 (d, J=7.6 Hz, 1H) (aromático y vinílico), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 422.2 (M+1).

Ejemplo 173

[2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 168 precedente se obtuvo el compuesto deseado (60 mg, 0.2 mmol).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 0.891, 0.907 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.49 (t, J=10.4Hz, 2H), 2.40, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2.41 (m, 2H, CH₂), 2.74 (m, 4H), 3.30 (m, 2H), 6.82 (dd, J=4.5, 8.7Hz, 1H), 6.90 (td, $^2J=2.4$, $^3J=8.4$ Hz, 1H), 7.42 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.74 (dd, J=4.6, 8.4Hz, 1H) (aromático y vinílico), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.65 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 438.4 (M-1).

Ejemplo 174

[2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-Cloro-2-oxo-1,2-dihidro-Indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 171 precedente, se obtuvo el compuesto deseado (31.2 mg, 34%) a partir de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (63 mg, 0.2 mmol).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.15, 1.16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.95 (t, J=11.6Hz, 2H, CH₂), 2.40, 2.42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 2H, CH₂), 3.03 (d, J=11.2Hz, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.85 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.11 (dd, J=2.0, 8.0Hz, 1H), 7.52 (t,

172
174

J=5.6Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.97 (d, J=2.0Hz, 1H) (aromático y vinílico), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.63 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 456.2 (M+1).

Ejemplo 175

[2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etil]amida del ácido 5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 171 se obtuvo el compuesto deseado (40 mg, 40%) a partir de 5-ácido [5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (74 mg, 0.2 mmol).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.15, 1.16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.95 (t, J=11.6Hz, 2H, CH₂), 2.40, 2.42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 2H, CH₂), 3.03 (d, J=10.4Hz, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.81 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.24 (dd, J=2.0, 8.4Hz, 1H), 7.51 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.10 (d, J=2.0Hz, 1H) (aromático y vinílico), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 498.4 (M-1).

Ejemplos Biológicos

Los siguientes ensayos se emplean para hallar aquellos compuestos que demuestran el grado óptimo de la actividad deseada.

A. Procedimientos de Ensayo

Pueden usarse los siguientes ensayos para determinar el nivel de actividad y el efecto de los distintos compuestos de la presente invención sobre una o más PK. Pueden diseñarse ensayos semejantes junto con las mismas líneas para cualquier PK usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Varios de los ensayos que se describen en la presente documentación se realizan en un formato de ELISA (Ensayo Compuesto Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas) (Voller, *et al.*, 1980, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," Manual of Clinical Immunology, 2ª edición, Friedman, Am. Soc. Of

175
175

Microbiology, Washington, D.C., páginas 359-371). El procedimiento general es como sigue: se introduce un compuesto en células que expresan la quinasa de prueba, ya sea en forma natural o recombinante, por un período seleccionado de tiempo después del cual, si la quinasa de prueba es un receptor, se agrega un ligando que sea un activador conocido del receptor. Las células se lisan y se transfiere el lisado a las cavidades de una placa de ELISA previamente cubierta con un anticuerpo específico que reconoce el sustrato de la reacción de fosforilación enzimática. Los componentes distintos del sustrato en el lisado de células se lavan y se detecta la cantidad de fosforilación del sustrato con un anticuerpo que reconozca específicamente la fosfotirosina, en comparación con las células control que no fueron puestas en contacto con el compuesto de prueba.

Los protocolos presentemente preferidos para llevar a cabo los experimentos de ELISA sobre PK específicas se proveen a continuación. Sin embargo, la adaptación de estos protocolos para determinar la actividad de compuestos contra otras RTK, así como contra otras CTK y STK, está dentro del alcance del conocimiento de aquellos entrenados en la técnica. Otros ensayos que se describen en la presente documentación miden la cantidad de AND generado como respuesta a la activación de una quinasa de prueba, lo cual es una medida general de una respuesta proliferativa. El procedimiento general para este ensayo es como sigue: se introduce un compuesto en células que expresan la quinasa de prueba, ya sea en forma natural o recombinante, por un período seleccionado de tiempo después del cual, si la quinasa de prueba es un receptor, se agrega un ligando que sea un activador conocido del receptor. Después de una incubación por al menos una noche, se agrega un

12th
176

reactivo marcador de AND, tal como 5-bromodesoxuridina (BrdU) o H³-timidina. Se detecta la cantidad de AND marcado con un anticuerpo anti-BrdU o midiendo la radiactividad, y se la compara con las células control que no fueron puestas en contacto con un compuesto de prueba.

BIOENSAYO DE GST-FLK-1

Este ensayo analiza la actividad de la tirosin quinasa de GST-Flk1 sobre péptidos poli(glu,tyr).

Materiales y Reactivos:

1. Placas de ELISA Coming de 96 cavidades (N° de Catálogo Coming 5805-96).
2. Poli(glu,tyr) 4: 1, liofilizado (CatálogoSigma # P0275).
3. Preparación de placas de ensayo cubiertas con poli(glu,tyr)(pEY): se cubre con 2 ug/cavidad de poli(glu,tyr)(pEY) en 100 ul de PBS, se mantiene a temperatura ambiente por 2 horas o a 4°C por una noche. Se cubren bien las placas para evitar la evaporación.
4. Buffer PBS: para obtener 1 l, se mezclan 0,2 g de KH₂PO₄, 1,15 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KCl y 8 g de NaCl en aproximadamente 900 ml de dH₂O. Cuando se han disuelto todos los reactivos, se ajusta el pH a 7,2 con HCl. Se lleva el volumen total a 1 l con dH₂O.
5. Buffer PBST: a 1 l de buffer PBS se agrega 1,0 ml de Tween-20.
6. Buffer de bloqueo TBB: para obtener 1 l, se mezclan 1,21 g de TRIS, 8,77 g de NaCl, 1 ml de TWEEN-20 en aproximadamente 900 ml de dH₂O. Se ajusta el pH a 7,2 con HCl. Se agregan 10 g de BSA, se agita para disolver. Se lleva el volumen total a 1 l con dH₂O. Se filtra para retirar la materia particulada.

175
177

7. 1% de BSA en PBS: para hacer una solución de trabajo 1x, se agregan 10 g de BSA a aproximadamente 990 ml de buffer PBS, se agita para disolver. Se ajusta el volumen total a 1 L con buffer PBS, se filtra para retirar la materia particulada.
8. Hepes 50 mM pH 7,5.
9. GST-Flk1cd purificado a partir de la transformación de baculovirus recombinantes sf9 (SUGEN, Inc.).
10. DMSO al 4% en dH₂O.
11. ATP 10 mM en dH₂O.
12. MnCl₂ 40 mM
13. Buffer de Dilución de Quinasas (KDB): se mezclan 10 ml de Hepes (pH 7,5), 1 ml de NaCl 5 M, 40 µl de ortovanadato de sodio 100 mM y 0,4 ml de BSA al 5% en dH₂O con 88,56 ml de dH₂O.
14. Placas NUNC de polipropileno de 96 cavidades con fondo en V, Catálogo Applied Scientific # AS-72092
15. EDTA: se mezclan 14,12 g de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en aproximadamente 70 ml de dH₂O. Se agrega NaOH 10 N hasta que se disuelve el EDTA. Se ajusta el pH a 8,0. Se ajusta el volumen total a 100 ml con dH₂O.
16. 1º Buffer de Dilución de Anticuerpos: se mezclan 10 ml de BSA al 5% en Buffer PBS con 89,5 ml de TBST.
17. Anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano picante (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech).
18. Ácido 2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Moss, Catálogo N° ABST).

176
178**19. 10% de SDS.****Procedimiento:**

1. Se cubren las placas de ELISA Corning de 96 cavidades con 2 μ g de péptido poliEY en PBS estéril, como se describe en el paso 3 de Materiales y Reactivos.
2. se retira el líquido no unido de las cavidades invirtiendo la placa. Se lava una vez con TBST. Se frota la placa contra una toalla de papel para retirar el líquido en exceso.
3. Se agregan 100 μ l de BSA al 1% en PBS a cada cavidad. Se incuba, con agitación, por 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se repite el paso 2.
5. Se lavan las cavidades con HEPES 50 mM (pH 7,5) (150 μ l/cavidad).
6. Se diluye el compuesto de prueba con dH_2O /4% de DMSO hasta 4 veces la concentración final del ensayo en las placas de polipropileno de 96 cavidades.
7. Se agregan 25 μ l de compuesto de prueba diluido a la placa de ELISA. En las cavidades control, se colocan 25 μ l de dH_2O /4% de DMSO.
8. Se agregan 25 μ l de MnCl_2 40 mM con 4x ATP (2 μ M) a cada cavidad.
9. Se agregan 25 μ l de EDTA 0,5 M a las cavidades del control negativo.
10. Se diluye GST-FIk1 hasta 0,005 μ g(5 ng)/cavidad con KDB.
11. Se agregan 50 μ l de enzima diluida a cada cavidad.

177
179

12. Se incuba, con agitación, por 15 minutos a temperatura ambiente.
13. Se detiene la reacción agregando 50 µl de EDTA 250 mM (pH 8,0).
14. Se lava 3X con TBST y Se frota la placa contra una toalla de papel para retirar el líquido en exceso.
15. Se agregan 100 µl por cavidad de conjugado anti-fosfotirosina HRP, se realiza una dilución 1: 5000 en buffer de dilución de anticuerpos. Se incuba, con agitación, por 90 minutos a temperatura ambiente.
16. Se lava como en el paso 14.
17. Se agregan 100 µl de una solución de ABTS a temperatura ambiente a cada cavidad.
18. Se incuba, con agitación, por 10 a 15 minutos. Se retira cualquier burbuja.
19. Se detiene la reacción agregando 20 µl de SDS al 10% a cada cavidad.
20. Se leen los resultados en un lector de ELISA Dynatech MR7000 con un filtro de prueba a 410 nm y un filtro de referencia a 630 nm.

BIOENSAYO DE PYK2

Se usa este ensayo para medir la actividad de quinasa in vivo de pyk2 (FL.pyk2-HA) completo marcado con epitopes HA en un ensayo de ELISA.

Materiales y reactivos:

1. Placas de ELISA Corning de 96 cavidades.
2. Anticuerpo monoclonal 12CA5 anti-HA (SUGEN, Inc.)
3. PBS (Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Catálogo Gibco # 450-1300EB)
4. Buffer TBST: para obtener 1 l, se mezclan 8,786 g de NaCl, 6,057 g

175
180

de TRIS y 1 ml de Triton X-100 al 0,1% en aproximadamente 900 ml de dH₂O. Se ajusta el pH a 7,2, se lleva el volumen a 1 L.

5. Buffer de bloqueo: para obtener 1 l, se mezclan 100 g de BSA al 10%, 12,1 g de TRIS 100 mM, 58,44 g de NaCl 1 M y 10 ml de TWEEN-20 al 1%.
6. Lisados de células FL.pyk2-HA de sf9 (SUGEN, Inc.).
7. 4% de DMSO en MilliQue H₂O.
8. ATP 10 mM en dH₂O.
9. MnCl₂ 1 M.
10. MgCl₂ 1 M.
11. Dithiothreitol (DTT) 1 M.
12. Buffer de fosforilación de quinasas 10X: se mezclan 5,0 ml de Hepes 1 M (pH 7,5), 0,2 ml de MnCl₂ 1 M, 1,0 ml de MgCl₂ 1 M, 1,0 ml de Triton X-100 al 10% en 2,8 ml de dH₂O. Justo antes de usarlo, se agregan 0,1 ml de DTT 1 M.
13. Placas de polipropileno NUNC de 96 cavidades de fondo en V.
14. EDTA 500 mM en dH₂O.
15. Buffer de dilución de anticuerpos: para obtener 100 ml, se mezcla 1 ml de BSA al 5%/PBS y 1 ml de Tween-20 al 10% en 88 ml de TBS.
16. Anti-Ptyr PY99 conjugado con HRP, Santa Cruz Biotech Catálogo N° SC-7020.
17. ABTS, Moss, Catálogo N° ABST-2000.
18. 10% de SDS.

Procedimiento:

1. Se cubren las placas Corning de ELISA de 96 cavidades con 0,5 µg

175
18

por cavidad de anticuerpo 12CA5 anti-HA en 100 μ l de PBS. Se almacena por una noche a 4°C.

2. Se retira el anticuerpo HA no unido de las cavidades invirtiendo la placa. Se lava la placa con dH_2O . Se frota la placa contra una toalla de papel para retirar el líquido en exceso.
3. Se agregan 150 μ l de Buffer de Bloqueo a cada cavidad. Se incuba, con agitación, por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se lava la placa 4x con TBS-T.
5. Se diluye el lisado en PBS (1,5 μ g de lisado/100 μ l de PBS).
6. Se agregan 100 μ l de lisado diluido a cada cavidad. Se agita a temperatura ambiente por 1 hora.
7. Se lava como en el paso 4.
8. Se agregan 50 μ l de buffer quinasas 2X a la placa de ELISA que contiene la pyk2-HA capturada.
9. Se agregan 25 μ l del compuesto de prueba 400 μ M en DMSO al 4% a cada cavidad. Para las cavidades control, se usa DMSO al 4% solo.
10. Se agregan 25 μ l de EDTA 0,5 M a las cavidades de control negativo.
11. Se agregan 25 μ l de ATP 20 μ M a todas las cavidades. Se incuba, con agitación, por 10 minutos.
12. Se detiene la reacción agregando 25 μ l de EDTA 500 mM (pH 8,0) a todas las cavidades.
13. Se lava como en el paso 4.
14. Se agregan 100 μ l de anti-Ptyr conjugado con HRP diluido 1: 6000

195
182

en Buffer de Dilución de Anticuerpos a cada cavidad. Se incuba, con agitación, por 1 hora a temperatura ambiente.

15. Se lava la placa 3X con TBST y 1X con PBS.
16. Se agregan 100 μ l de solución ABST a cada cavidad.
17. Si resulta necesario, se detiene la reacción de revelado agregando 20 μ l SDS al 10% a cada cavidad.
18. Se lee la placa en un lector de ELISA con un filtro de prueba a 410 nm y un filtro de referencia a 630 nm.

BIOENSAYO DE FGFR1

Este ensayo se usa para medir la actividad de quinasa in vitro de FGF1-R en un ensayo de ELISA.

Materiales y Reactivos:

1. Placas de ELISA Costar de 96 cavidades (Catálogo Corning # 3369).
2. Poli(Glu-Tyr) (Catálogo Sigma # PO275).
3. PBS (Catálogo Gibco # 450-1300EB)
4. Solución Buffer Hepes 50 mM.
5. Buffer de Bloqueo (BSA al 5%/PBS).
6. GST-FGFR1 purificado (SUGEN, Inc.)
7. Buffer de Dilución de Quinasa.

Se mezclan 500 μ l de Hepes 1 M (GIBCO), 20 μ l de BSA al 5%/PBS, 10 μ l de ortovanadato de sodio 100mM y 50 μ l de NaCl 5M.

8. ATP 10 mM
9. Mezcla de fosforilación ATP/MnCl₂: se mezclan 20 μ l de ATP, 400 μ l de MnCl₂ 1 M y 9,58 ml de dH₂O.

19x
18

10. Placas de polipropileno NUNC de 96 cavidades con fondo en V (Catálogo Applied Scientific # AS-72092).
 11. EDTA 0,5 M.
 12. 0,05% de TBST
- Se agregan 500 µl de TWEEN a 1 litro de TBS.
13. Suero policlonal de conejo anti-fosfotirosina (SUGEN, Inc.).
 14. Conjugado anti conejo de IgG peroxidasa (Biosource, Catálogo # ALI0404).
 15. Solución de ABTS.
 16. Solución de ABTS/H₂O₂.

Procedimiento:

1. Se cubren las placas de ELISA Costar de 96 cavidades con 1 µg por cavidad de Poli(Glu,Tyr) en 100 µl de PBS. Se almacena por una noche a 4°C.
2. Se lavan las placas cubiertas una vez con PBS.
3. Se agregan 150 µl de BSA al 5%/PBS Buffer de Bloqueo a cada cavidad. Se incuba, con agitación, por 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se lava la placa 2x con PBS, luego una vez con Hepes 50 mM. Se frota las placas contra una toalla de papel para retirar el líquido en exceso y las burbujas.
5. Se agregan 25 µl de compuesto de prueba 0,4 mM en DMSO al 4% o DMSO al 4% solo (controles) a la placa.
6. Se diluye el GST-FGFR1 purificado en Buffer de Dilución de Quinasa (5 ng de quinasa/50 µl de KDB/cavidad).

7. Se agregan 50 µl de quinasa diluida a cada cavidad.
8. Se comienza la reacción de la quinasa agregando 25 µl/cavidad de ATP/Mn⁺⁺ preparado fresco (0,4 ml de MnCl₂ 1 M, 40 µl de ATP 10 mM, 9,56 ml de dH₂O, preparado fresco).
9. Esta es una primera reacción de quinasa y debe detenerse con 25 µl de EDTA 0,5 M de una manera similar al agregado de ATP.
10. Se lava la placa 4x con TBST fresco.
11. Se prepara el Buffer de Dilución de Anticuerpos: para obtener 50 ml: se mezclan 5 ml de BSA al 5%, 250 µl de 5% de leche y 50 µl de vanadato de sodio 100 mM, se lleva hasta el volumen final con 0,05% de TBST.
12. Se agregan 100 µl por cavidad de anti-fosfotirosina (dilución 1: 10000 en ADB). Se incuba, con agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
13. Se lava como en el paso 10.
14. Se agregan 100 µl por cavidad de conjugado de peroxidasa Biosource de cabra anti conejo (dilución 1: 6000 en ADB). Se incuba, con agitación, por 1 hora a temperatura ambiente.
15. Se lava como en el paso 10 y luego con PBS para retirar las burbujas y el exceso de TWEEN.
16. Se agregan 100 µl de solución de ABTS/H₂O₂ a cada cavidad.
17. Se incuba, con agitación, por 10 a 20 minutos. Se retira cualquier burbuja.
18. Se lee el ensayo en un lector de ELISA Dynatech MR7000: filtro de prueba a 410 nm, filtro de referencia a 630 nm.

BIOENSAYO DE EGFR

Se usa este ensayo para medir la actividad quinasa in vitro de FGF1-R en un ensayo de ELISA.

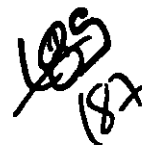
Materiales y Reactivos:

1. Placas de ELISA Corning de 96 cavidades.
2. Anticuerpo SUMO1 monoclonal anti-EGFR (SUGEN, Inc.).
3. PBS
4. Buffer TBST
5. Buffer de Bloqueo: para obtener 100 ml, se mezclan 5,0 g de leche Carnation Instant Non-fat Milk® con 100 ml de PBS.
6. Lisado de células A431 (SUGEN, Inc.).
7. Buffer TBS:
8. TBS + 10% de DMSO: para obtener 1 l, se mezclan 1,514 g de TRIS, 2,192 g de NaCl y 25 ml de DMSO; se lleva hasta un volumen total de 1 litro con dH₂O.
9. ATP (Adenosina-5'-trifosfato, de músculo de equino, Sigma, Catálogo N° A-5394), solución 1,0 mM en dH₂O. Este reactivo debería prepararse inmediatamente antes de usarlo y mantenerse en hielo.
10. MnCl₂ 1,0 mM.
11. Mezcla de fosforilación ATP/MnCl₂: para preparar 10 ml, se mezclan 300 µl de ATP 1 mM, MnCl₂ 500 µl y 9,2 ml de dH₂O. Se prepara justo antes de usarla, se mantiene en hielo.
12. Placas de polipropileno NUNC de 96 cavidades con fondo en V.
13. EDTA.

14. Suero de conejo policlonal anti-fosfotirosina (SUGEN, Inc.).
15. Conjugado anti conejo de IgG peroxidasa de cabra (Biosource, Catálogo N° ALI0404).
16. ABTS.
17. 30% de peróxido de hidrógeno.
18. ABTS/H₂O₂.
19. HCl 0,2 M.

Procedimiento:

1. Se cubren las placas Coming de ELISA de 96 cavidades con 0,5 µg de SUMO1 en 100 µl PBS por cavidad, se almacena por una noche a 4°C.
2. Se retira el SUMO1 no unido de las cavidades invirtiendo la placa para eliminar el líquido. Se lava 1x con dH₂O. Se frota la placa contra una toalla de papel para retirar el líquido en exceso.
3. Se agregan 150 µl de Buffer de Bloqueo a cada cavidad. Se incuba, con agitación, por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se lava la placa 3x con agua deionizada, luego una vez con TBST. Se frota las placas contra una toalla de papel para retirar el líquido en exceso y las burbujas.
5. Se diluye el lisado en PBS (7 µg de lisado/100 µl de PBS).
6. Se agregan 100 µl de lisado diluido a cada cavidad. Se agita a temperatura ambiente por 1 hora.
7. Se lavan las placas como en 4, anteriormente.
8. Se agregan 120 µl de TBS a la placa de ELISA que contiene el EGFR capturado.



9. Se diluye el compuesto de prueba 1: 10 en TBS, se lo coloca en la cavidad.
10. Se agregan 13,5 μ l de compuesto de prueba diluido a la placa de ELISA. A las cavidades control, se agregan 13,5 μ l de TBS en DMSO al 10%.
11. Se incuba, con agitación, por 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Se agregan 15 μ l de buffer de fosforilación, se mezcla en todas las cavidades excepto en la cavidad de control negativo. El volumen final de las cavidades debería ser de aproximadamente 150 μ l, con una concentración final de ATP 3 μ M/MnCl₂ 5 mM en cada cavidad. Se incuba con agitación por 5 minutos.
13. Se detiene la reacción agregando 16,5 μ l de solución de EDTA con agitación. Se agita por otro minuto.
14. Se lava 4x con agua deionizada, 2x con TBST.
15. Se agregan 100 μ l de anti-fosfotirosina (dilución 1: 3000 en TBST) por cavidad. Se incuba, con agitación, por 30-45 minutos a temperatura ambiente.
16. Se lava como en 4, anteriormente.
17. Se agregan 100 μ l de Conjugado Biosource anti conejo de IgG peroxidasa de cabra (dilución 1: 2000 en TBST) a cada cavidad. Se incuba con agitación por 30 minutos a temperatura ambiente.
18. Se lava como en 4, anteriormente.
19. Se agregan 100 μ l de solución de ABTS/H₂O₂ a cada cavidad.
20. Se incuba por 5 a 10 minutos con agitación. Se retira cualquier burbuja.

21. Si resulta necesario, se detiene la reacción agregando 100 µl de HCl 0,2 M por cavidad.
22. Se lee el ensayo en un lector de ELISA Dynatech MR7000: filtro de prueba a 410 nm, filtro de referencia a 630 nm.

BIOENSAYO DE PDGFR

Se usa este ensayo para medir la actividad de quinasa in vivo de FGF1-R en un ensayo de ELISA.

Materiales y Reactivos:

1. Placas de ELISA Coming de 96 cavidades
2. Anticuerpo 28D4C10 monoclonal anti-PDGFR (SUGEN, Inc.).
3. PBS.
4. Buffer TBST.
5. Buffer de Bloqueo (el mismo que para el bioensayo de EGFR).
6. Lisado de células PDGFR-β que expresa NIH 3T3 (SUGEN, Inc.).
7. Buffer TBS.
8. TBS + DMSO al 10%.
9. ATP.
10. MnCl₂.
11. Mezcla de buffer de fosforilación de quinasa: para obtener 10 ml, se mezclan 250 µl de TRIS 1 M, 200 µl de NaCl 5M, 100 µl de MnCl₂ 1 M y 50 µl de Triton X-100 100 mM en suficiente dH₂O para preparar 10 ml.
12. Placas de polipropileno NUNC de 96 cavidades con fondo en V.
13. EDTA.
14. Suero de conejo policlonal anti-fosfotirosina (SUGEN, Inc.).

15. Conjugado anti conejo de IgG peroxidasa de cabra (Biosource, Catálogo N° ALI0404).
16. ABTS.
17. Peróxido de hidrógeno, solución al 30%.
18. ABTS/H₂O₂.
19. HCl 0,2 M.

Procedimiento:

1. Se cubren las placas Coming de ELISA de 96 cavidades con 0,5 µg de 28D4C10 en 100 µl de PBS por cavidad, se almacena por una noche a 4°C.
2. Se retira el 28D4C10 no unido de las cavidades invirtiendo la placa para eliminar el líquido. Se lava 1x con dH₂O. Se frota la placa contra una toalla de papel para retirar el líquido en exceso.
3. Se agregan 150 µl de Buffer de Bloqueo a cada cavidad. Se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación.
4. Se lava la placa 3x con agua deionizada, luego una vez con TBST. Se frota las placas contra una toalla de papel para retirar el líquido en exceso y las burbujas.
5. Se diluye el lisado en HNTG (10 µg de lisado/100 µl de HNTG).
6. Se agregan 100 µl de lisado diluido a cada cavidad. Se agita a temperatura ambiente por 60 minutos.
7. Se lava la placas como se describe en el paso 4.
8. Se agregan 80 µl de buffer de trabajo de quinasa, se mezclan en la placa de ELISA que contiene el PDGFR capturado.
9. Se diluye el compuesto de prueba 1: 10 en TBS en placas de

180
190

polipropileno de 96 cavidades.

10. Se agregan 10 μ l de compuesto de prueba diluido a la placa de ELISA. A las cavidades control, se agregan 10 μ l TBS + DMSO al 10%. Se incuba con agitación por 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Se agregan 10 μ l de ATP directamente a todas las cavidades, excepto a la cavidad de control negativo (el volumen final por cavidad debería ser de aproximadamente 100 μ l con ATP 20 μ M en cada cavidad). Se incuba por 30 minutos con agitación.
12. Se detiene la reacción agregando 10 μ l de solución de EDTA a cada cavidad.
13. Se lava 4x con agua deionizada, dos veces con TBST.
14. Se agregan 100 μ l de anti-fosfotirosina (dilución 1: 3000 en TBST) por cavidad. Se incuba con agitación por 30-45 minutos a temperatura ambiente.
15. Se lava como en el paso 4.
16. Se agregan 100 μ l Conjugado Blosource anti conejo de IgG peroxidasa de cabra (dilución 1: 2000 en TBST) a cada cavidad. Se incuba con agitación por 30 minutos a temperatura ambiente.
17. Se lava como en el paso 4.
18. Se agregan 100 μ l de solución de ABTS/ H_2O_2 a cada cavidad.
19. Se incuba por 10 a 30 minutos con agitación. Se retira cualquier burbuja.
20. Si resulta necesario, se detiene la reacción con el agregado de 100 μ l de HCl 0,2 M por cavidad.

21. Se lee el ensayo en un lector de ELISA Dynatech MR7000 con un filtro de prueba a 410 nm y un filtro de referencia a 630 nm.

ENSAYO CELULAR DE HER-2 QUINASA

Se usa este ensayo para medir la actividad de la HER-2 quinasa en células completas en un formato de ELISA.

Materiales y Reactivos:

1. DMEM (Catálogo Gibco # 11965-092).
2. Suero Fetal Bovino (FBS, Catálogo Gibco # 16000-044), inactivado con calor en un baño de agua por 30 minutos a 56°C
3. Tripsina (Catálogo Gibco # 25200-056).
4. L-Glutamina (Catálogo Gibco # 25030-081)
5. HEPES (Catálogo Gibco # 15630-080).
6. Medio de Crecimiento

Se mezclan 500 ml de DMEM, 55 ml de FBS inactivado con calor, 10 ml de HEPES y 5,5 ml de L-Glutamina.

7. Medio de Hambreado

Se mezclan 500 ml de DMEM, 2,5 ml de FBS inactivado con calor, 10 ml de HEPES y 5,5 ml de L-Glutamina.

8. PBS.
9. Placas de microtitulación de cultivo de tejido de 96 cavidades de fondo plano (Catálogo Corning # 25860).
10. Platos de cultivo de tejido de 15 cm (Catálogo Corning # 08757148).
11. Placas de ELISA Corning de 96 cavidades.
12. Placas de polipropileno NUNC de 96 cavidades con fondo en V.
13. Cartuchos de transferencia Costar para el Transtar 96 (Catálogo

Costar # 7610).

14. Anticuerpo SUMO 1 monoclonal anti-EGFR (SUGEN, Inc.).
15. Buffer TBST.
16. Buffer de Bloqueo: 5% de leche Carnation Instant Milk® en PBS.
17. Ligando EGF: EGF-201, Shinko American, Japón. Se suspende el polvo en 100 μ l de HCl 10mM. Se agregan 100 μ l de NaOH 10 mM. Se agregan 800 μ l de PBS y se lo transfiere a un tubo Eppendorf, se almacena a -20°C hasta que está listo para usar.
18. Buffer de Lisis HNTG
Para obtener una solución madre 5X de HNTG, se mezclan 23,83 g de Hepes, 43,83 g de NaCl, 500 ml de glicerol y 100 ml de Triton X-100 con suficiente dH_2O para preparar 1 l de solución total.
Para obtener HNTG 1X*, se mezclan 2 ml de HNTG, 100 μ l de Na_3VO_4 0,1 M, 250 μ l de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,2 M y 100 μ l de EDTA.
19. EDTA.
20. Na_3VO_4 . Para preparar la solución madre, se mezclan 1,84 g de Na_3VO_4 con 80 ml de dH_2O . Se ajusta el pH a 10. Se hierve en un microondas por un minuto (la solución se torna clara). Se enfría hasta temperatura ambiente. Se ajusta el pH a 10. Se repite el ciclo de calentamiento/enfriamiento hasta que el pH permanezca en 10.
21. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 200 mM.
22. Antisuero policlonal de conejo específico para fosfotirosina (anticuerpo anti-Ptyr, SUGEN, Inc.).
23. Antisuero purificado por afinidad, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugado de peroxidasa (Catálogo Biosource # ALI0404).

24. Solución de ABTS.
25. Solución de peróxido de hidrógeno al 30%.
26. ABTS/H₂O₂.
27. HCl 0,2 M.

Procedimiento:

1. Se cubren las placas Corning de ELISA de 96 cavidades con SUMO1 a 1,0 ug por cavidad en PBS, 100 ul de volumen final/cavidad. Se almacena por una noche a 4°C.
2. El día del uso, se retira el buffer de cobertura y se lava la placa 3 veces con dH₂O y una vez con Buffer TBST. Todos los lavados en este ensayo deberían hacerse de este modo, a menos que se especifique algo diferente.
3. Se agregan 100 ul de Buffer de Bloqueo a cada cavidad. Se incuba la placa, con agitación, por 30 minutos a temperatura ambiente. Justo antes del uso, se lava la placa.
4. Se usa la EGFr/quimera HER-2/línea de células 3T3-C7 para este ensayo.
5. Se eligen placas que tienen una confluencia del 80 al 90 %. Se colectan las células por tripsinización y se las centrifuga a 1000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Se suspenden nuevamente las células en medio de hambreado y se las cuenta con azul tripan. Se requiere una viabilidad superior al 90%. Se siembran las células en medio de hambreado a una densidad de 2500 células por cavidad, 90 ul por cavidad, en una placa de microtitulación de 96 cavidades. Se incuban las células

sembradas por una noche a 37°C bajo 5% de CO₂.

7. Se inicia el ensayo dos días después de sembrar.
8. Los compuestos de prueba se disuelven en DMSO al 4%. Las muestras se diluyen luego adicionalmente directamente en las placas con DMEM para hambreado. Típicamente, esta dilución será de 1: 10 o mayor. Se transfieren luego todas las cavidades a la placa de células con una dilución adicional de 1: 10 (se coloca una muestra de 10 µl en 90 µl de medio de hambreado). La concentración final de DMSO debería ser de 1% o menor. Puede usarse también una dilución serial común.
9. Se incuba bajo 5% de CO₂ a 37°C por 2 horas.
10. Se prepara el ligando EGF diluyendo la solución madre de EGF (16,5 µM) en DMEM tibio hasta 150 nM.
11. Se prepara el HNTG* fresco en cantidad suficiente para obtener 100 µl por cavidad; se lo coloca en hielo.
12. Después de incubar por 2 horas con el compuesto de prueba, se agregan los ligandos EGF preparados a las células, 50 µl por cavidad, para una concentración final de 50 nM. Las cavidades de control positivo reciben la misma cantidad de EGF. Los controles negativos no reciben EGF. Se incuba a 37° C por 10 minutos.
13. Se retira el compuesto de prueba, el EGF y el DMEM. Se lavan las células una vez con PBS.
14. Se transfiere el HNTG* a las células, 100 µl por cavidad. Se coloca en hielo por 5 minutos. Entretanto, se retira el Buffer de Bloqueo de la placa de ELISA y se lava.

15. Se separan células de la placa con una micropipeta y se homogeiniza el material celular aspirando repetidamente y dispersando el buffer de lisis HNTG*. Se transfiere el lisado a una placa de ELISA cubierta, bloqueada y lavada, o se usa un cartucho de transferencia Costar para transferir el lisado a la placa.
16. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente por 1 hora.
17. Se retira el lisado, se lava. Se transfiere el anticuerpo anti-Ptyr diluido fresco (1: 3000 en TBST) a la placa de ELISA, 100 ul por cavidad.
18. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente, por 30 minutos.
19. Se retira el anticuerpo anti-Ptyr, se lava. Se transfiere el anticuerpo BIOSOURCE diluido fresco a la placa de ELISA (1: 8000 en TBST, 100 ul por cavidad).
20. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente por 30 minutos.
21. Se retira el anticuerpo BIOSOURCE, se lava. Se transfiere la solución de ABTS/H₂O₂ preparada fresca a la placa de ELISA, 100 ul por cavidad.
22. Se incuba, con agitación, por 5-10 minutos. Se retira cualquier burbuja.
23. Se detiene la reacción con el agregado de 100 ul de HCl 0,2 M por cavidad.
24. Se lee el ensayo en un lector de ELISA Dynatech MR7000 con un filtro de prueba fijado a 410 nm y un filtro de referencia a 630 nm.

ENSAYO DE CDK2/CICLINA A

Se usa este ensayo para medir la actividad in vivo de serin/treonin quinasa

de la cdk2/ciclina A humana en un Ensayo de Proximidad de centelleo (SPA).

Materiales y Reactivos.

1. Placas de tereftalato de polietileno Wallac de 96 cavidades (flexi) (Wallac, Catálogo # 1450-401).
2. ATP Amersham Redivue [$\gamma^{32}\text{P}$] (Catálogo Amersham # AH 9968).
3. Esferas SPA Amersham de poliviniltolueno cubiertas con estreptavidina (Catálogo Amersham # RPNQ0007). Las esferas deberían reconstituirse en PBS sin magnesio o calcio, a 20 mg/ml.
4. Complejo activado de enzimas cdk2/ciclina A purificado a partir de células Sf9 (SUGEN, Inc.).
5. Péptido sustrato biotinilado (Debtide). El péptido biotin-X-PKTPKKAKKL se disuelve en dH_2O a una concentración de 5 mg/ml.
6. Mezcla de péptido/ATP: para obtener 10 ml, se mezclan 9,979 ml de dH_2O , 0,00125 ml de ATP "frío", 0,010 ml de Debtide y 0,010 ml de $\gamma^{32}\text{P}$ ATP. La concentración final por cavidad será de 0,5 μM de ATP "frío", 0,1 μg de Debtide y 0,2 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ ATP.
7. Buffer de Quinasa: para obtener 10 ml, se mezclan 8,85 ml de dH_2O , 0,625 ml de TRIS (pH 7,4), 0,25 ml de MgCl_2 1 M, 0,25 ml de NP40 al 10% y 0,025 ml de DTT 1 M, agregado fresco justo antes del uso.
8. ATP 10 mM en dH_2O .
9. TRIS 1 M, pH ajustado a 7,4 con HCl.
10. MgCl_2 1 M.
11. DTT 1 M.

12. PBS (Catálogo Gibco # 14190-144).
13. EDTA 0,5 M.
14. Solución de Detención: Para obtener 10 ml, se mezclan 9,25 ml de PBS, 0,005 ml de ATP 100 mM, 0,1 ml de EDTA 0,5 M, 0,1 ml de 10% Triton X-100 y 1,25 ml de 20 mg/ml de esferas SPA.

Procedimiento:

1. Se preparan soluciones de compuestos de prueba a 5 veces la concentración final deseada en DMSO al 5%. Se agregan 10 μ l a cada cavidad. Para los controles negativos, se usan 10 μ l de DMSO al 5% solo en las cavidades.
2. Se diluyen 5 μ l de solución de cdk2/ciclina A con 2,1 ml de buffer de quinasa 2x.
3. Se agregan 20 μ l de enzima a cada cavidad.
4. Se agregan 10 μ l de EDTA 0,5 M a las cavidades de control negativo.
5. Para comenzar la reacción de las quinasas, se agregan 20 μ l de mezcla de péptido/ATP a cada cavidad. Se incuba por 1 hora. sin agitación.
6. Se agregan 200 μ l de solución de detención a cada cavidad.
7. Se espera al menos 10 minutos.
8. Se centrifuga la placa a aproximadamente 2300 rpm por 3-5 minutos.
9. Se cuenta la placa usando un Trilux o un lector similar.

ENSAYO DE MET TRANSFOSFORILACIÓN

Se usa este ensayo para medir los niveles de fosfotirosina en un sustrato

de poli (ácido glutámico: tirosina (4: 1)) como medio de identificación de agonistas/antagonistas de met transfosforilación del sustrato.

Materiales y Reactivos:

1. Placas de ELISA Coming de 96 cavidades, Catálogo Coming # 25805-96.
2. Poli(glu, tyr) 4: 1, Sigma, Catálogo N° P 0275.
3. PBS, Catálogo Gibco # 450-1300EB
4. HEPES 50 mM
5. Buffer de Bloqueo: Se disuelven 25 g de Albúmina de Suero Bovino, Catálogo Sigma N° A-7888, en 500 ml de PBS, se filtra a través de un filtro de 4 µm.
6. Proteína de fusión GST que contiene el dominio de la Met quinasa, Sugan, Inc.
7. Buffer TBST.
8. 10% de (MilliQue H₂O) DMSO acuoso.
9. 10 mM de (dH₂O) Adenosin-5'-trifosfato acuoso, Sigma Catálogo N° A-5394.
10. Buffer de Dilución de Quinasa 2X: para obtener 100 ml, se mezclan 10 ml de Hepes 1 M a pH 7,5 con 0,4 ml de BSA al 5%/PBS, 0,2 ml de ortovanadato de sodio 0,1 M y 1 ml de cloruro de sodio 5 M en 88,4 ml de dH₂O.
11. Mezcla de reacción de ATP 4X: para obtener 10 ml, se mezclan 0,4 ml de cloruro de manganeso 1 M y 0,02 ml de 0,1 M ATP en 9,56 ml de dH₂O.
12. Mezcla de Controles Negativos 4X: para obtener 10 ml, se mezclan

0,4 ml de cloruro de manganeso 1 M en 9,6 ml de dH_2O .

13. Placas de polipropileno NUNC de 96 cavidades con fondo en V, Catálogo Applied Scientific # S-72092
14. EDTA 500 mM.
15. Buffer de Dilución de Anticuerpos: para obtener 100 ml, se mezclan 10 ml de BSA al 5%/PBS, 0,5 ml de 5% de leche Carnation Instant Milk® en PBS y 0,1 ml de ortovanadato de sodio 0,1 M en 88,4 ml de TBST.
16. Anticuerpo policlonal de conejo antofosfotirosina, Sugan, Inc.
17. Anticuerpo de cabra anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante, Biosource, Inc.
18. Solución de ABTS: para obtener 1 l, se mezclan 19,21 g de ácido cítrico, 35,49 g de Na_2HPO_4 y 500 mg de ABTS con suficiente dH_2O para preparar 1 l.
19. $\text{ABTS}/\text{H}_2\text{O}_2$: se mezclan 15 ml de solución de ABST con $2\mu\text{l}$ H_2O_2 cinco minutos antes de usarlo.
20. HCl 0,2 M

Procedimiento:

1. Se cubren las placa de ELISA con 2 μg de Poli(Glu-Tyr) en 100 μl de PBS, se almacena por una noche a 4°C .
2. Se bloquea la placa con 150 μl de BSA al 5%/ PBS por 60 minutos.
3. Se lava la placa dos veces con PBS, una vez con buffer de HEPES 50 mM, pH 7,4.
4. Se agregan 50 μl de la quinasa diluida a todas las cavidades. (se diluye la quinasa purificada con Buffer de Dilución de Quinasa. La

concentración final debería ser de 10 ng/cavidad).

5. Se agregan 25 µl del compuesto de prueba (en DMSO al 4%) o DMSO solo (4% en dH₂O) a la placa, para los controles.
6. Se incuba la mezcla de quinasa/compuesto por 15 minutos.
7. Se agregan 25 µl de MnCl₂ 40 mM a las cavidades de control negativo.
8. Se agregan 25 µl de mezcla de ATP/ MnCl₂ a todas las otras cavidades (excepto a los controles negativos). Se incuba por 5 minutos.
9. Se agregan 25 µl de EDTA 500 mM para detener la reacción.
10. Se lava la placa 3x con TBST.
11. Se agregan 100 µl de anti-Ptyr policlonal de conejo diluida 1: 10,000 en Buffer de Dilución de Anticuerpos a cada cavidad. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente por una hora.
12. Se lava la placa 3x con TBST.
13. Se diluye el anticuerpo Biosource conjugado con HRP 1: 6000 en Buffer de Dilución de Anticuerpos. Se agregan 100 µl por cavidad y se incuba a temperatura ambiente, con agitación, por una hora.
14. Se lava la placa 1X con PBS.
15. Se agregan 100 µl de solución de ABTS/H₂O₂ a cada cavidad.
16. Si resulta necesario, se detiene la reacción de revelado con el agregado de 100 µl de HCl 0,2 M por cavidad.
17. Se lee la placa en un lector de ELISA Dynatech MR7000 con el filtro de prueba a 410 nm y el filtro de referencia a 630 nm.

IGF-1 TRANSFOSFORILACIÓN ASSAY

Se usa este ensayo para medir el nivel de fosfotirosina en poli (ácido glutámico: tirosina) (4: 1) de modo de identificar agonistas/antagonistas de la transfosforilación de gst-IGF-1.

Materiales y Reactivos:

1. Placas de ELISA Coming de 96 cavidades.
2. Poli (Glu-tyr) (4: 1), Sigma Catálogo N° P 0275.
3. PBS, Catálogo Gibco # 450-1300EB.
4. HEPES 50 mM
5. TBB Buffer de Bloqueo: para obtener 1 l, se mezclan 100 g de BSA, 12,1 g de TRIS (pH 7,5), 58,44 g de cloruro de sodio y 10 ml de TWEEN-20 al 1%.
6. Proteína de fusión GST purificada que contiene el dominio IGF-1 de la quinasa (Sugen, Inc.)
7. Buffer TBST: para obtener 1 l, se mezclan 8,057 g de Tris, 8,766 g de cloruro de sodio y 0,5 ml de TWEEN-20 con suficiente dH₂O para preparar 1 litro.
8. DMSO al 4% en Milli-Q H₂O.
9. ATP 10 mM en dH₂O.
10. Buffer de Dilución de Quinasa 2X: para obtener 100 ml, se mezclan 10 ml de 1 M HEPES (pH 7,5), 0,4 ml de BSA al 5% en dH₂O, 0,2 ml de ortovanadato de sodio 0,1 M y 1 ml de cloruro de sodio 5 M con suficiente dH₂O para preparar 100 ml.
11. Mezcla de Reacción de ATP 4X: para obtener 10 ml, se mezclan 0,4 ml de MnCl₂ 1 M y 0,008 ml de ATP 0,01 M y 9,56 ml de dH₂O.

Mezcla de Controles Negativos 12,4X: se mezclan 0,4 ml de cloruro de

200
202

manganeso 1 M en 9,80 ml de dH_2O .

13. Placas de polipropileno NUNC de 96 cavidades con fondo en V.
14. EDTA 500 mM en dH_2O .
15. Buffer de Dilución de Anticuerpos: para obtener 100 ml, se mezclan 10 ml de BSA al 5% en PBS, 0,5 ml de 5% leche Carnation Instant Non-fat Milk® en PBS y 0,1 ml de ortovanadato de sodio 0,1 M en 88,4 ml de TBST.
16. Anticuerpo antifosforina policlonal de conejo, Sugan, Inc.
17. Anticuerpo de cabra anti conejo conjugado con HRP, Biosource.
18. Solución de ABTS.
20. $\text{ABTS}/\text{H}_2\text{O}_2$: se mezclan 15 ml de ABTS con 2 μl de H_2O_2 5 minutos antes de usarlo.
21. HCl 0,2 M en dH_2O .

Procedimiento:

1. Se cubre la placa de ELISA con 2,0 μg /cavidad de poli(Glu, Tyr) 4: 1 (Sigma P0275) en 100 μl de PBS. Se almacena la placa por una noche a 4° C.
2. Se lava la placa una vez con PBS.
3. Se agregan 100 μl de TBB Buffer de Bloqueo a cada cavidad. Se incuba la placa por 1 hora con agitación a temperatura ambiente.
4. Se lava la placa una vez con PBS, luego dos veces con buffer HEPES 50 mM, pH 7,5.
5. Se agregan 25 μl de compuesto de prueba en DMSO al 4% (obtenido diluyendo una solución madre de compuesto de prueba 10 mM en DMSO al 100% con dH_2O) a la placa.

201
203

6. Se agregan 10,0 ng de gst-IGF-1 quinasa en 50 μ l de Buffer de Dilución de Quinasa) a todas las cavidades.
7. Se comienza la reacción de quinasa agregando 25 μ l de Mezcla de Reacción de ATP 4X a todas las cavidades de prueba y a las cavidades de control positivo. Se agregan 25 μ l de Mezcla de Controles Negativos 4X a todas las cavidades de control Negativo. Se incuba por 10 minutos con agitación a temperatura ambiente.
8. Se agregan 25 μ l de EDTA 0,5 M (pH 8,0) a todas las cavidades.
9. Se lava la placa 4x con Buffer TBST.
10. Se agrega antisuero policlonal de conejo anti-fosfotirosina a una dilución de 1: 10000 en 100 μ l de Buffer de Dilución de Anticuerpos a todas las cavidades. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente por 1 hora.
11. Se lava la placa como en el paso 9.
12. Se agregan 100 μ l de HRP Biosource anti conejo a una dilución de 1: 10000 en Buffer de Dilución de Anticuerpos a todas las cavidades. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente por 1 hora.
13. Se lava la placa como en el paso 9, Se sigue con un lavado con PBS para reducir las burbujas y el exceso de Tween-20.
14. Se revela agregando 100 μ l/cavidad de ABTS/H₂O₂ a cada cavidad.
15. Después de alrededor de 5 minutos, se lee en un lector de ELISA con un filtro de prueba a 410 nm y un filtro de referencia a 630 nm.

ENSAYOS DE INCORPORACIÓN DE BRDU

Los siguientes ensayos usan células modificadas para que expresen un

receptor seleccionado y luego evalúan el efecto de un compuesto de interés sobre la actividad de la síntesis de ADN inducida por ligando determinando la incorporación de BrdU en el DNA.

Los siguientes materiales, reactivos y procedimientos son generales para cada uno de los ensayos de incorporación de BrdU. Se indican las variaciones en los ensayos específicos.

Materiales y Reactivos:

1. El ligando apropiado.
2. Las células modificadas apropiadas.
3. Reactivo de marcado de BrdU: 10 mM, en PBS (pH 7,4) (Boehringer Mannheim, Alemania).
4. FixDenat solución de fijación (lista para usar) (Boehringer Mannheim, Alemania).
5. Anti-BrdU-POD: anticuerpo de ratón conjugado con peroxidasa (Boehringer Mannheim, Alemania).
6. Solución de Sustrato TMB: tetrametilbenzidina (TMB, Boehringer Mannheim, Alemania).
7. Solución de Lavado en PBS: 1X PBS, pH 7,4.
8. Albúmina Bovina (BSA), fracción V de polvo (Sigma Chemical Co., EEUU).

Procedimiento General:

1. Las células se siembran a razón de 8000 células/cavidad en 10% de CS, Glu 2 mM en DMEM, en una placa de 96 cavidades. Las células se incuban por una noche a 37°C en 5% de CO₂.
2. Después de 24 horas, las células se lavan con PBS, y luego se

hambread con suero en un medio libre de suero (0% de CS DMEM con 0,1% de BSA) por 24 horas.

3. El día 3, el ligando apropiado y el compuesto de prueba se agregan a las células simultáneamente. Las cavidades de control negativo reciben DMEM libre de suero con 0,1% de BSA solamente; las células de control positivo reciben el ligando pero ningún compuesto de prueba. Los compuestos de prueba se preparan en DMEM libre de suero con ligando en una placa de 96 cavidades y se los diluye en forma serial para 7 concentraciones de prueba.
4. Después de 18 horas de activación de ligando, se agrega el reactivo diluido de marcado con BrdU (1: 100 en DMEM, 0,1% BSA) y se incuban las células con BrdU (concentración final = 10 μ M) por 1,5 horas.
5. Después de la incubación con reactivo de marcado, se retira el medio decantando y frotando la placa invertida en una toalla de papel. Se agrega solución FixDenat (50 μ l/cavidad) y se incuban las placas a temperatura ambiente por 45 minutos en un agitador de placas.
6. Se retira exhaustivamente la solución FbxDenat decantando y frotando la placa invertida contra una toalla de papel. Se agrega leche (5% de leche deshidratada en PBS, 200 μ l/cavidad) como una solución de bloqueo y se incuba la placa por 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas.
7. Se retira la solución de bloqueo por decantación y se lavan las cavidades una vez con PBS. Se agrega solución anti-BrdU-POD

20A
206

(dilución 1: 200 en PBS, 1% de BSA) (50 µl/cavidad) y se incuba la placa por 90 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas.

8. Se retira exhaustivamente el conjugado de anticuerpos decantando y lavando las cavidades 5 veces con PBS, y se seca la placa por inversión y frotación contra una toalla de papel.
9. Se agrega solución de sustrato TMB (100 µl/cavidad) y se la incuba por 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas hasta que el revelado de color es suficiente para una detección fotométrica.
10. Se mide la absorbancia de las muestras a 410 nm (en el modo de "doble longitud de onda" con una lectura de filtro a 490 nm como longitud de onda de referencia) en un lector Dynatech de placas de ELISA.

Ensayo de Incorporación de BrdU Inducida por EGF

Materiales y Reactivos:

1. EGF de ratón, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japón).
2. 3T3/EGFRc7.

Ensayo de Incorporación de BrdU Inducida por EGF conducida por Her-2

Materiales y Reactivos:

1. EGF de ratón, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japón).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr con un dominio de quinasa Her-2).

Ensayo de Incorporación de BrdU Inducida por EGF conducida por Her-4

Materiales y Reactivos:

1. EGF de ratón, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japón).

205
20A

2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr (EGFr con un dominio de quinasa Her-4).

Ensayo de Incorporación de BrdU Inducida por PDGF**Materiales y Reactivos:**

1. PDGF B/B humana (Boehringer Mannheim, Alemania).
2. 3T3/EGFRc7.

Ensayo de Incorporación de BrdU Inducida por FGF**Materiales y Reactivos:**

1. FGF2/bFGF humana (Gibco BRL, EEUU).
2. 3T3c7/EGFr

Ensayo de Incorporación de BrdU Inducida por IGF-1**Materiales y Reactivos:**

1. G511 humana recombinante (Promega Corp., EEUU)
2. 3T3/IGF1r.

Ensayo de Incorporación de BrdU Inducida por Insulina**Materiales y Reactivos:**

1. Insulina, cristalina, bovina, Cinc (13007, Gibco BRL, EEUU).
2. 3T3/H25.

Ensayo de Incorporación de BrdU Inducida por HGF**Materiales y Reactivos:**

1. HGF humana recombinante (Catálogo N° 249-HG, R&D Systems, Inc. EEUU).
2. Células BxPC-3 (ATCC CRL-1687).

Procedimiento:

1. Se siembran las células a razón de 9000 células/cavidad en RPMI con 10% de FBS en una placa de 96 cavidades. Las células se

incubaban por una noche a 37°C en 5% de CO₂.

2. Después de 24 horas, las células se lavan con PBS, y luego se hambreadan en suero en 100 µl de medio libre de suero (RPMI con 0,1% de BSA) por 24 horas.
3. El día 3, se agregan 25 µl que contienen ligando (preparados a razón de 1 µg/ml en RPMI con 0,1% de BSA; la concentración final de HGF es de 200 ng/ml) y los compuestos de prueba a las células. Las cavidades de control negativo reciben 25 µl de RPMI libre de suero con 0,1% de BSA solamente; las células de control positivo reciben el ligando (HGF) pero ningún compuesto de prueba. Los compuestos de prueba se preparan a 5 veces su concentración final en RPMI libre de suero con ligando en una placa de 96 cavidades, y se diluyen en forma serial para dar 7 concentraciones de prueba. Típicamente, la mayor concentración final de compuesto de prueba es de 100 µM y se usan diluciones de 1: 3 (es decir, un rango de concentración final de compuesto de prueba de 0,137-100 µM).
4. Después de 18 horas de activación de ligando, se agregan 12,5 µl de reactivo diluido de marcado con BrdU (1: 100 en RPMI, 0,1% de BSA) a cada cavidad y se incuban las células con BrdU (la concentración final es de 10 µM) por 1 hora.
5. Igual que en el Procedimiento General.
6. Igual que en el Procedimiento General.
7. Se retira la solución de bloqueo por decantación y se lavan las cavidades una vez con PBS. Se agrega solución anti-BrdU-POD (dilución 1: 100 en PBS, 1% de BSA) (100 µl/cavidad) y se incuba la

placa por 90 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas.

8. Igual que en el Procedimiento General.
9. Igual que en el Procedimiento General.
10. Igual que en el Procedimiento General.

Ensayo de HUV-EC-C

Se usa este ensayo para medir la actividad de un compuesto contra PDGF-R, FGF-R, VEGF, FGF o Flk-1/KDR, todos los cuales son expresados por células HUV-EC.

DÍA 0

1. Se lavan y se tripsinizan células HUV-EC-C (células endoteliales de la vena umbilical humana, (Colección Americana de Tipos de Cultivo, Catálogo N° 1730 CRL). Se lava con solución salina tamponada de Dulbecco (D-PBS, obtenida de Gibco BRL, Catálogo N° 14190-029) 2 veces a alrededor de 1 ml/frasco de cultivo de tejido de 10 cm². Se tripsiniza con 0,05% de tripsina-EDTA en una solución no enzimática de disociación de células (Sigma Chemical Company, Catálogo N° C-1544). La tripsina al 0,05% se prepara diluyendo 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Gibco, Catálogo N° 25200-049) en la solución de disociación de células. Se tripsiniza con alrededor de 1 ml/frasco de cultivo de tejidos de 25-30 cm² por alrededor de 5 minutos a 37°C. Después de que las células se han desprendido del frasco, se agrega un volumen igual de medio de ensayo y se lo transfiere a un tubo estéril de centrifuga de 50 ml (Fisher Scientific, Catálogo N° 05-539-6).

2. Se lavan las células con alrededor de 35 ml de medio de ensayo en el tubo estéril de centrifuga de 50 ml agregando el medio de ensayo, se centrifuga

por 10 minutos a aproximadamente 200 x G, se aspira el sobrenadante y se suspende nuevamente con 35 ml de D-PBS. Se repite el lavado dos veces más con D-PBS, se suspenden nuevamente las células en alrededor de 1 ml de medio de ensayo/frasco de cultivo de tejidos de 15 cm². El medio de ensayo consiste en medio F12K (Gibco BRL, Catálogo N° 21127-014) y 0,5% de Suero Fetal Bovino inactivado por calor. Se cuentan las células con un contador Coulter® (Coulter Electronics, Inc.) y se agrega medio de ensayo a las células para obtener una concentración de 0,8-1,0 x 10⁵ células/ml.

3. Se agregan células a placas de 96 cavidades de fondo plano a razón de 100 µl/cavidad o 0,8-1,0 x 10⁴ células/cavidad, se incuba aproximadamente por 24 horas a 37°C, en 5% de CO₂.

DÍA 1

1. Se preparan titulaciones dobles de compuesto de prueba en placas separadas de 96 cavidades, generalmente desde 50 µM hasta 0 µM. Se usa el mismo medio de ensayo que se mencionó en el día 0, paso 2 anterior. Las titulaciones se hacen agregando 90 µl/cavidad de compuesto de prueba a 200 µM (4X la concentración final por cavidad) a la cavidad superior de una columna particular de la placa. Como la solución madre de compuesto de prueba es comúnmente 20 mM en DMSO, la concentración de droga 200 µM contiene 2% de DMSO.

Se usa un diluyente preparado en 2% de DMSO en medio de ensayo (F12K + 0,5% de Suero Fetal Bovino) como diluyente para las titulaciones con compuesto de prueba con el fin de diluir el compuesto de prueba y mantener constante la concentración de DMSO. Se agrega este diluyente a las cavidades restantes en la columna en una cantidad de 60 µl/cavidad. Se toman 60 µl de los

120 μ l de la dilución 200 μ M de compuesto de prueba en la cavidad superior de la columna y se los mezcla con los 60 μ l en la segunda cavidad de la columna. Se toman 60 μ l de esta cavidad y se los mezcla con los 60 μ l en la tercera cavidad de la columna, y así hasta que se completan titulaciones dobles. Cuando se mezclan la primera y la última cavidad, se toman 60 μ l de los 120 μ l en esta cavidad y se los descarta. Se deja la última cavidad con 60 μ l de DMSO/medio diluyente a modo de control que no contiene compuesto de prueba. Se hacen 9 columnas de compuesto de prueba titulado, suficiente para triplicar las cavidades, cada una por: (1) VEGF (obtenido de Pepro Tech Inc., Catálogo N° 100-200), (2) factor de crecimiento endotelial (ECGF) (también conocido como factor de crecimiento de fibroblastos ácido, o aFGF) (obtenido de Boehringer Mannheim Biochemica, Catálogo N° 1439 600), o (3) PDGF B/B humana (1276-956, Boehringer Mannheim, Alemania), y medio de ensayo control. El ECGF viene como una preparación con heparina de sodio.

2. Se transfieren 50 μ l/cavidad de las diluciones de compuesto de prueba a las placas de ensayo de 96 cavidades que contienen las $0,8-1,0 \times 10^4$ células/100 μ l/cavidad de las células HUV-EC-C desde el día 0 y se incuba por aproximadamente 2 horas a 37°C, bajo 5% de CO₂.

3. Por triplicado, se agregan 50 μ l/cavidad de 80 μ g/ml de VEGF, 20 ng/ml de ECGF, o medio de control a cada condición de compuesto de prueba. Al igual que con los compuestos de prueba, las concentraciones de los factores de crecimiento son 4X la concentración final deseada. Se usa el medio de ensayo del día 0, paso 2 para preparar las concentraciones de factores de crecimiento. Se incuba aproximadamente por 24 horas a 37°C, bajo 5% de CO₂. Cada cavidad tendrá 50 μ l de dilución de compuesto de prueba, 50 μ l de factor de crecimiento o

medio, y 100 μ l de células, lo que brinda un total de 200 μ l/cavidad. Así, las concentraciones 4X de compuesto de prueba y de factores de crecimiento se convierten en 1X una vez que se ha agregado todo a las cavidades.

DÍA 2

1. Se agrega ^{3} H-timidina (Amersham, Catálogo N° TRK-886) a 1 μ Ci/cavidad (10 μ l/cavidad de una solución de 100 μ Ci/ml preparada en medio RPMI + 10% Suero Fetal Bovino inactivado con calor) y se incuba aproximadamente por 24 horas a 37°C, en 5% de CO₂. El RPMI se obtiene de Gibco BRL, Catálogo N° 11875-051.

DÍA 3

1. Se congelan las placas por una noche a -20°C.

DÍA 4

Se descongelan las placas y se cosecha con un cosechador de placas de 96 cavidades (Tomtec Harvester 96®) en paneles de filtro (Wallac, Catálogo N° 1205-401), se leen los conteos en un contador de centelleo líquido Wallac Betaplate™.

La TABLA 2 muestra los resultados de la evaluación biológica de algunos compuestos ejemplares de esta invención. Los resultados se informan en términos de IC₅₀, la concentración micromolar (μ M) de compuesto a evaluar que causa un cambio del 50% en la actividad de la PKT blanco en comparación con la actividad de la PTK en un control al cual no se ha agregado compuesto de prueba. Específicamente, los resultados indican la concentración de compuesto de prueba que se necesita para causar una reducción del 50% de la actividad de la PTK blanco. Los bioensayos que se han usado o que pueden usarse para evaluar compuestos se describen en detalle a continuación.

24
23

TABLA 2

Ejemplo	blo flkGST IC50 (μM)	blo FGFR1 IC50 (μM)	blo PDGF IC50 (μM)	blo EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Quinas a IC50 (μM)	cdk2ep a C50 (μM)	blo pyk2 IC50 (μM)
1	57,68	15,16	>100	>100	>100			>100
2	>100		>100	>100	>100			
3	9,85	9,62	>100	>100	>100			>100
4	3,57	>20	>100	>100	>100	>100		
5	8,3	16,06	>100	>100	>100	>100		
6	4,04		>100	3,26	7,82	2,43		
7	7,74		>100	5,07	9,8	4,24		
8	12,1		>100	51,34	20,06	5,5		
9	0,96		>100	>100	>100	16,38		
10	5,72		>100	94,04	15,66	8,06		
11	9,77		>100	>100	>100	>100		
12	>20		21,46	>100		27,73		
13	>20		61,92	8,17		2,66		
14	13,01		42,41	>100		66,02		
15	>20		>100	>100		96,61		
16	>20		96,06	>100		23,32		
17	8,25	2,47	94,35	0,83	11,47	15,94	>10	
18	2,67			2,57	9,23	4,99		
19	7,5			6,86	34,18	8,37		
20	11,53			>100	41,16	8		

222
214

Ejemplo	blo flkGST IC50 (μ M)	blo FGFR1 IC50 (μ M)	blo PDGF IC50 (μ M)	blo EGF IC50 (μ M)	cell EGF IC50 (μ M)	Her2 Quinase IC50 (μ M)	cdk2sp a C50 (μ M)	blo pyk2 IC50 (μ M)
21	7,18		>100	40,34		27,89		
22	>20		>100	>100		87,87		
23	>20		>100	36,84		4,05		
24			>100	16,84		5,31		
25	12,55		>100	23,48		7,9		
26	18,03		86,87	34,67		10,04		
27			>100	26,5		3,91		
28	4,5		71,27	53,88		2,87		
29	10,12		>100	28,72		3,98		
30	9,4		>100	18,89		4,1		
31	>50		>100	9,83		47,19		
32	45,74		5,94	>100		>100		
34	>50		>100	>100		>100		
35	>20		>100	80,4		54,14		
36	>20		>100	>100		>100		
37	0,22		3,06	10,78	9,84	1,4		
38	4,17		3,06	6,04	8,97	2,16		20,43
39	3,38		4,69	3,67	14,54	3,53		
40	4,5		7,9	6,52		6,27		
42	0,1		0,12	11,95	74,55	20,43		
43	1,12		8,38	>100	37,33	53,37		

24/5

Ejemplo	blo flkGST IC50 (μ M)	blo FGFR1 IC50 (μ M)	blo PDGF IC50 (μ M)	blo EGF IC50 (μ M)	cell EGF IC50 (μ M)	Her2 Quinasa IC50 (μ M)	cdk2sp a C50 (μ M)	blo pyk2 IC50 (μ M)
44	<0,05		0,02	20,73	67,48	6,99		
45	1,71		>100	>100	29,95	>100		
46	30,62		6,18	>100	>100	>100		
47	0,08	1,56	0,06	11,42	41,54	8,4	>20	1,05
48	0,008	0,3	<0,78	17,88	21,58	7,93		0,09
49			<0,78	>100	43,88	>100		
50			<0,78	>100	20,34	>100		
51	0,006	1,66	0,01	18,1	21,81	23,24	16,69	0,35
52	0,08	1,28	<0,78	12,53	>100	>100	10,66	0,45
53			<0,78	>100	>100	>100		
54	1,98		<0,78	23,88	9,76	7,02		
55	0,27		0,53	6,03	35,99	77,82		
56	2,32		3,19	>100	10,03	7,11		
57	0,06		7,98	>100	9,97	6,94		
58			21,14	>100	>100	>100		
59			<0,78	>100	>100	>100		
60			<0,78	>100	>100	>100		
61			<0,78	>100	>100	>100		
62	8,00		8,32	>100	>100	>100		
63	0,21		<0,78	8,59	>100	>100		
64	0,55		<0,78	30,49	>100	>100		

214
216

Ejemplo	blo flkGST IC50 (μ M)	blo FGFR1 IC50 (μ M)	blo PDGF IC50 (μ M)	blo EGF IC50 (μ M)	cell EGF IC50 (μ M)	Her2 Quinas a IC50 (μ M)	cdk2sp a C50 (μ M)	blo pyk2 IC50 (μ M)
65	0,37		<0,05	>100	74,38	15,97		
66	<0,05			>100	11,84	2,76		
67	0,39		24,77	31,38	19,79	2,56		
68	1,16		0,03	>100	23,52	34,13		
69	0,3		56,55	>100	97,54	>100		
70	0,09	1,50	0,0030	10,57	6,42	7,99	12,62	0,63
71	15,21		22,5	>100		9,91		
72	6,06		10,54	>100	39,94	9,65		
73	5,95		14,12	>100	39,5	8,59		
74	1,2		0,09	46,75		>100		
75	2,7		61,55	>100		>100		
76	3,33		19,18	5,11		3,01		
77	0,49		25,01	>100		>100		
78	1,94		70,62	9,33		4,25		
79	1,49		>100	27,39		>100		
80	0,13	4,29	0,001	>100		50,19	17,19	0,28
81	0,21		0,18	>100		>100		
82	2,03	7,69	6,88	>100		>100		0,31
83	0,34	0,41	9,46	2,18		86,9		0,006
84	1,38		12,51	67,2		5,66		0,006
85	0,2	0,8	2,59	>100		3,76		

25
217

Ejemplo	blo flkGST IC50 (μM)	blo FGFR1 IC50 (μM)	blo PDGF IC50 (μM)	blo EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Quinas a IC50 (μM)	cdk2sp a C50 (μM)	blo pyk2 IC50 (μM)
86	1,45	1,3	19,6	41,8		>100		3,58
87	3,27	7,56	6,46	>100		9,1		0,17
88	0,35	1,18	8,06	2,36		>100		0,09
89	7,84		47,58	8,53	9,67	15,97		
115	7,3		7,48	>100		>100	0,006	
116	>20		>100	>100		>100	<0,0005	
117	0,91		12,9	>100		>100	0,006	
118	1,93		1,2	>100		>100	0,002	
119	1,38		61,63	>100		>100	<0,0005	

MODELOS ANIMALES IN VIVO

MODELOS ANIMALES DE XENOINJERTO

La capacidad de los tumores humanos de crecer como xenoinjertos en ratones atímicos (por ejemplo, Balb/c, nu/nu) provee un modelo in vivo útil para estudiar la respuesta biológica ante terapias contra tumores humanos. Desde el primer xenotransplante exitoso de tumores humanos a ratones atímicos, (Rygaard y Povlsen, 1969, Acta Pathol. Microbial. Scand. 77: 758-760), se han transplantado muchas líneas de células tumorales humanas (por ejemplo, mamarias, pulmonares, genitourinarias, gastrointestinales, de cabeza y de cuello, de glioblastoma, de hueso y de melanomas malignos), creciendo exitosamente en ratones desnudos. Pueden usarse los siguientes ensayos para determinar el nivel de actividad, la especificidad y el efecto de los distintos compuestos de la presente

Invención. Existen tres tipos generales de ensayos útiles para evaluar los compuestos: celulares/catalíticos, celulares/biológicos e in vivo. El objeto de los ensayos celulares/catalíticos es determinar el efecto de un compuesto sobre la capacidad de una TK de fosforilar tirosinas en un sustrato conocido en una célula. El objeto de los ensayos celulares/biológicos es determinar el efecto de un compuesto sobre la respuesta biológica estimulada por la TK en una célula. El objeto de los ensayos in vivo es determinar el efecto de un compuesto en un modelo animal de una afección particular, tal como el cáncer.

Las líneas celulares adecuadas para los experimentos de xenoinjertos subcutáneos incluyen células C8 (glioma, ATCC # CCL 107), células A375 (melanoma, ATCC # CRL 1619), células A431 (carcinoma epidérmico, ATCC # CRL 1555), células Calu 6 (pulmón, ATCC # HTB 56), células PC3 (próstata, ATCC # CRL 1435), células SKOV3TP5 y fibroblastos NIH 3T3 modificados genéticamente para sobreexpresar EGFR, PDGFR, IGF-1R o cualquier otra quinasa de prueba. Puede usarse el siguiente protocolo para realizar los experimentos de xenoinjerto:

Se obtienen ratones hembra atímicos (BALB/c, nu/nu) de Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). Todos los animales se mantienen bajo condiciones de cuartos limpios en jaulas Micro-isolator con lechos Alpha-dri. Reciben alimento estéril para roedores y agua ad libitum.

Se cultivan las líneas de células en un medio apropiado (por ejemplo, MEM, DMEM, F10 de Ham, o F12 de Ham más 5% a 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) y glutamina 2 mM (GLN)). Todos los medios de cultivo de células, la glutamina y el Suero Fetal Bovino se adquieren en Gibco Life Technologies (Grand Island, NY) a menos que se indique algo diferente. Todas las células se

cultivan en una atmósfera húmeda de 90-95% de aire y 5-10% de CO₂ a 37°C. Todas las líneas de células se subcultivan rutinariamente dos veces por semana y son negativas para micoplasma, como puede determinárselo mediante el método Mycotect (Gibco).

Las células se cosechan en o cerca de la confluencia con 0,05% de Tripsina-EDTA y se las precipita a 450 x g por 10 minutos. los precipitados se suspenden nuevamente en PBS estéril (sin FBS) hasta una concentración particular, y las células se implantan en el costado posterior del ratón (8 - 10 ratones por grupo, 2 - 10 x 10⁶ células/animal). Se mide el crecimiento de los tumores por 3 a 6 semanas usando calibres con Vernier. Se calcula el volumen de los tumores como el producto de largo x ancho x alto, a menos que se indique algo diferente. Se calculan los valores de P usando la prueba t de Student. Pueden administrarse los compuestos de prueba en 50 - 100 µl de excipiente (DMSO o VPD: D5W) mediante una inyección IP a distintas concentraciones, comenzando generalmente un día después de la implantación.

MODELO DE INVASIÓN DE TUMORES

Se ha desarrollado el siguiente modelo de invasión de tumores y puede usárselo para la evaluación del valor terapéutico y de la eficacia de los compuestos identificados que inhiben selectivamente el receptor KDR/FLK-1.

Procedimiento

Se usan ratones desnudos de 8 semanas de edad (hembras) (Simonsen Inc.) como animales experimentales. La implantación de células tumorales puede realizarse en una campana de flujo laminar. Para la anestesia, se administra un cóctel de Xilazina/Ketamina (100 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de Xilazina) por vía intraperitoneal. Se realiza una incisión media para exponer

218
220

la cavidad abdominal (de aproximadamente 1,5 cm de largo) e inyectar 10^7 células tumorales en un volumen de 100 μ l de medio. Las células se inyectan en el lóbulo duodenal del páncreas o bajo la serosa del colon. Se cierran el peritoneo y los músculos con una sutura continua con seda 6-0 y se cierra la piel usando presillas metálicas. Los animales se observan diariamente.

Análisis

Después de 2-8 semanas, dependiendo de las observaciones realizadas en los animales, se sacrifican los ratones, y se separan y analizan las metástasis de los tumores locales a varios órganos (pulmón, hígado, cerebro, estómago, bazo, corazón y músculo), midiéndose el tamaño de los tumores, el grado de invasión, la inmunohistoquímica, realizándose determinaciones de hibridación in situ, etcétera.

ENSAYO DE C-KIT

Se usa este ensayo para detectar el nivel de fosforilación de c-kit tirosina.

Se hambreadon en suero células MO7E (leucemia mieloide aguda humana) por una noche en 0,1% de suero. Las células se trataron previamente con el compuesto (concurrente con el hambreado con suero), antes de la estimulación con ligando. Las células se estimularon con 250 ng/ml de rh-SCF por 15 minutos. Después de la estimulación, las células se lisaron y se las inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-c-kit. Se determinaron los niveles de fosfotirosina y de otras proteínas mediante Western blot.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE MTT

Se hambreadon células MO7E y se las trató previamente con el compuesto, tal como se describe para los experimentos de fosforilación. Las

células se plaquero a aproximadamente 4×10^5 células/cavidad en una placa de 96 cavidades, en 100 μ l de RPMI + 10% de suero. Se agregó rh-SCF (100 ng/ml) y se incubó la placa por 48 horas. Después de 48 horas, se agregaron 10 μ l de MTT a 5 mg/ml [bromuro de 3- (4,5- dimetiltiazol -2- il) -2,5- difenil tetrazolio] y se los dejó incubar por 4 horas. Se agregó isopropanol ácido (100 μ l de HCl 0,04N en isopropanol) y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm.

ENSAYO DE APOPTOSIS

Se incubaron células MO7E +/- SCF y +/- compuesto en 10% de FBS con rh-GM-CSF (10ng/ml) y rh-IL-3 (10ng/ml). Se evaluaron las muestras a las 24 y las 48 horas. Para medir la caspasa-3 activada, las muestras se lavaron con PBS y se permeabilizaron con etanol al 70% enfriado con hielo. Las células se colorearon luego con anticuerpo anti caspasa-3 activa policlonal de conejo conjugado con PE y se las analizó por FACS. Para medir la PARP cortada, se lisaron las muestras y se las analizó por Western blot con un anticuerpo -PARP.

Ensayos Adicionales

Los ensayos adicionales que pueden usarse para evaluar los compuestos de esta invención incluyen, sin limitaciones, un ensayo bio-flk-1, un ensayo de receptor EGF – receptor quimérico de HER2 en células completas, un ensayo bio-src, un ensayo bio-ick y un ensayo que mide la función de fosforilación de la raf. Pueden hallarse los protocolos para cada uno de estos ensayos en la Solicitud de los EEUU con Número Serial 09/099842, que se incorpora a modo de referencia, incluyendo cualquier dibujo, en la presente documentación.

220
132

Medición de la Toxicidad para las Células

Los compuestos terapéuticos deberían ser más potentes para inhibir la actividad de receptores de tirosin quinasa que para provocar un efecto citotóxico. Puede obtenerse una medida de la efectividad y de la toxicidad celular de un compuesto determinando el índice terapéutico, es decir, IC_{50}/LD_{50} . IC_{50} , la dosis requerida para lograr una inhibición del 50%, puede medirse usando técnicas comunes tales como aquellas que se describen en la presente documentación. LD_{50} , la dosificación que resulta en una toxicidad del 50%, puede medirse también mediante técnicas comunes (Mossman, 1983, J. Immunol. Methods, 65: 55-63), registrando la cantidad de LDH liberada (Korzeniewski y Callewaert, 1983, J. Immunol. Methods, 64: 313, Decker y Lohmann-Matthes, 1988, J. Immunol. Methods, 115: 61), o midiendo la dosis letal en modelos animales. Los compuestos con un gran índice terapéutico son los preferidos. El índice terapéutico debería ser mayor que 2, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 50.

B. Ejemplo de Resultados de un Ensayo Celular que Usa (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

Para confirmar la potencia de la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) detectada en los ensayos bioquímicos (véase a continuación), se evaluó la capacidad de dicho compuesto de inhibir la fosforilación de RTK dependiente de ligando en ensayos basados en células que usaban células de ratón NIH-3T3 modificadas para que sobreexpresaran Fik-1 o PDGFR β humana. La (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) inhibió la

fosforilación de la Flk-1 tirosina dependiente de VEGF con un valor aproximado de IC_{50} de 0,03 μ M. Este valor es similar al valor de 0,009 μ M de K_i determinado para la inhibición de Flk-1 por parte de la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) determinada en ensayos bioquímicos. Esto indica que la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) penetra fácilmente en las células. Consistente con los datos bioquímicos (véase a continuación), que indican que la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) tuvo efectos comparables contra Flk-1 y PDGFR β , se halló también que inhibió la fosforilación dependiente de PDGF en células con un valor de IC_{50} de aproximadamente 0,03 μ M. La capacidad de la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) de inhibir c-kit, una RTK relacionada cercanamente que se une al factor de células madre (SCF), fue determinada usando células MO7E que expresan este receptor. En estas células, la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) inhibió la fosforilación de c-kit dependiente de SCF con un valor de IC_{50} de 0,01–0,1 μ M. Este compuesto inhibió también la fosforilación de c-kit estimulada por SCF en blastos de leucemia mialoide aguda (AML) aislados de sangre periférica de pacientes.

Además de evaluar la capacidad de la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) de inhibir la fosforilación de receptores dependiente de ligando

222
224

en células, se examinó también su efecto sobre la respuesta proliferativa dependiente de ligando en células in vitro (véase la Tabla 3). En estos estudios, las células se sometieron a una quiescencia de una noche mediante hambreado en suero y luego se las indujo a sintetizar ADN al agregarles el ligando mitogénico apropiado. Como se muestra en la Tabla 3, la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) inhibió la proliferación inducida por PDGF de células NIH-3T3 que sobreexpresaban PDGFR β o PDGFR α con valores de IC₅₀ de 0,031 y 0,069 μ M, respectivamente, y la proliferación inducida por SCF de las células MO7E con un valor de IC₅₀ de 0,007 μ M.

TABLA 3

Receptor	Bioquímico	IC ₅₀ Celular	
	K _i ¹ (μ M)	Fosforilación del Receptor (μ M)	Proliferación dependiente de ligando (μ M)
Fik-1/KDR	0,009	0,03 ²	0,004 ³
PDGFR α	0,008	0,03 ⁴	0,031 ⁴
PDGFR β	ND	ND	0,069 ⁵
FGFR	0,83	ND	0,7 ³
c-kit	ND	0,01-0,1 ⁶	0,007 ⁶

223
225

- ND = No Determinado

¹ Determinado usando la enzima recombinante

² Determinado usando células NIH-3T3 hambreadas con suero que expresan Flk-1

³ Determinado usando HUVEC hambreadas con suero

⁴ Determinado usando células NIH-3T3 hambreadas con suero que expresan PDGFR β

⁵ Determinado usando células NIH-3T3 hambreadas con suero que expresan PDGFR α

⁶ Determinado usando células MO7E hambreadas con suero

Como se muestra en la Tabla 3, existe un acuerdo general entre las actividades bioquímicas y de otro tipo de la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) que apoya la conclusión de que este compuesto cruza las membranas celulares. Además, puede concluirse que las respuestas celulares son un resultado de la actividad del compuesto 80 contra el blanco indicado. En contraste, cuando se lo evaluó en presencia de un medio de crecimiento completo in vitro, se requirieron concentraciones sustancialmente mayores de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) (>10 μ M) para inhibir el crecimiento de una variedad de células tumorales humanas (véase la Tabla 4). Esto indica que el compuesto no inhibió directamente el crecimiento de estas células a las concentraciones requeridas para inhibir la fosforilación del receptor y la proliferación celular dependiente de ligando.

TABLA 4

224
226

Línea celular	Origen	IC ₅₀ (μM)	LD ₅₀ (μM)
HT29	Carcinoma de colon	10	22
A549	Carcinoma de pulmón	9,5	22
NCI-H460	Carcinoma de pulmón NSC	8,9	20
SF767T	Glioma	7,9	14
A431	Carcinoma epidérmico	6,0	18

Brevemente, los resultados que se muestran en la Tabla 4 se obtuvieron incubando las células por 48 horas en un medio de crecimiento completo en presencia de diluciones seriales de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico. Al final del período de crecimiento, se determinó la cantidad relativa de células. Se calcularon los valores de IC₅₀ como la concentración de compuesto que inhibió el crecimiento de las células en un 50% en comparación con las células sin tratar. Se calcularon los valores de LD₅₀ como la concentración de compuesto que causó una reducción del 50% en la cantidad de células respecto de aquellas en el inicio del experimento.

Un ensayo más relevante basado en células para evaluar el potencia alti angiogénico de la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) es el ensayo de mitogénesis in vitro que usa células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) como sistema modelo para la proliferación de células

endoteliales crítica en el proceso angiogénico. En este ensayo, se induce una respuesta mitogénica, medida como un aumento en la síntesis de ADN, en HUVECs hambreadas con suero al agregar VEGF o FGF. En estas células, la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) inhibió la respuesta mitogénica inducida por VEGF y FGF de una manera dependiente de la dosis con valores de IC_{50} de 0,004 μ M y 0,7 μ M, respectivamente, cuando el compuesto estuvo presente a lo largo del ensayo de 48 horas.

Brevemente, los resultados anteriores se obtuvieron usando HUVEC hambreadas en suero que se incubaron con concentraciones mitogénicas de VEGF (100 ng/ml) o FGF (30 ng/ml) en presencia de diluciones seriales de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) por 24 horas. Se cuantificó el inhibidor y la respuesta mitogénica durante las siguientes 24 horas en presencia de ligando por medio de la medición de la síntesis de ADN basada en la incorporación de bromodesoxiuridina en el ADN celular.

En experimentos separados, el compuesto 80 inhibió la fosforilación de ERK 1/2 dependiente de VEGF (p42/44MAP quinasa), un blanco previo temprano de Flk-1/KDR, de una manera dependiente de la dosis. Se mostró también que la actividad inhibitoria del compuesto 80 se prolongaba en este sistema, inhibiendo la fosforilación de ERK 1/2 dependiente de VEGF por períodos tan extensos como 48 después de la remoción de la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) del medio luego de una exposición breve (2 horas) a concentraciones micromolares del compuesto.

Se ha reconocido que el VEGF es un factor importante de supervivencia para las células endoteliales. Como la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) inhibe la respuesta mitogénica dependiente de VEGF en HUVEC, se investigó el efecto del compuesto sobre la supervivencia de las HUVEC. En estos experimentos, se usó el corte del sustrato de la caspasa-3 poli-ADP-riboseil polimerasa (PARP) como lectura de apoptosis. Las HUVEC cultivadas en condiciones libres de suero por 24 horas mostraron niveles sustanciales de corte con PARP, como se detectó por medio de la acumulación del fragmento de corte de 23 kDa de PARP. Esto fue evitado en gran medida por el agregado de VEGF al medio celular, lo que indica que VEGF actúa como un factor de supervivencia en este ensayo. Se ha demostrado que la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) inhibe la señalización de KDR. Por consiguiente, la (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-Floro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (Compuesto 80) inhibió la supervivencia de HUVEC mediada por VEGF en una manera dependiente de la dosis. Así, estos datos indican que el compuesto 80 indujo la apoptosis en células endoteliales en cultivo en presencia de VEGF.

C. Estudios de Eficacia *in vivo*

I. Eficacia Contra Xenoinjertos de Tumor Establecidos

La eficacia *in vivo* del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)amida (Compuesto 80) se estudió en modelos de xenoinjerto subcutáneos (SC), usando células de tumores humanos, implantadas en la región de la ijada posterior de

ratones atímicos. Luego de la implantación, los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño de 100–550 mm³ antes de iniciar el tratamiento oral con el Compuesto.

La administración oral diaria del Compuesto 80 provocó una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento del tumor A431, cuando se inició el tratamiento después de que los tumores habían crecido hasta un tamaño de 400 mm³. Lo que es estadísticamente importante ($P < 0,05$), la inhibición del crecimiento del tumor se observó a dosis de 40 mg/kg/día (74% inhibición) y 80 mg/kg/día (84% inhibición) (ver Tabla 6). En experimentos preliminares, una dosis más alta (160 mg/kg/día) del Compuesto no fue más eficaz contra los tumores A431 establecidos que la dosis de 80 mg/kg/día. Además, los ratones tratados con la dosis de 160 mg/kg/día del Compuesto perdieron peso corporal, lo que indica que la dosis más alta no fue tolerada tan bien. Se obtuvieron resultados similares en un experimento en el cual los tumores A431 sólo se dejaron crecer hasta un tamaño de 100 mm³ (ver Tabla 5). En este segundo experimento, una completa regresión de los tumores tuvo lugar en seis de los ocho animales tratados a 80 mg/kg/día durante 21 días. En estos seis animales, los tumores no volvieron a crecer durante un período de observación de 110 días, luego de terminar el tratamiento. En los dos animales en los cuales los tumores volvieron a crecer hasta un tamaño grande (2000–3000 mm³), los tumores hicieron una regresión en respuesta a una segunda ronda de tratamiento con el Compuesto 80. Lo que es importante, en todos los experimentos de eficacia, el ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)amida (Compuesto 80) a 80 mg/kg/día se ha tolerado bien, aun cuando se dosificó continuamente durante más de 100 días.

TABLA 5

228
230

Volumen Tumor Inicial (mm ³)	Compuesto ¹ (mg/kg/día)	% Inhibición (día)	Valor P
400	80	84 (36)	0,001
	40	74 (36)	0,003
	20	51 (36)	0,130
100	80	93 (40)	0,002
	40	75 (40)	0,015
	10	61 (40)	0,059
¹ Compuesto 80.			

En resumen, los resultados mostrados en la Tabla 5 se obtuvieron usando células A431 (0,5 x 10⁶ células/ratón), las cuales se implantaron SC en la región de la ijada posterior de ratones atímicos. La administración oral diaria de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)amida (Compuesto 80) en un vehículo a base de Cremoforo o el control del vehículo comenzó cuando los tumores alcanzaron el volumen promedio indicado. Se midieron los tumores usando calibres de nonio, y se calculó el volumen del tumor como el producto de longitud x ancho x altura. Se calcularon los valores P comparando el tamaño de los tumores para los animales que fueron tratados con Compuesto 80 (n=8), con los de animales que fueron tratados con un vehículo (n=16) el último día del experimento, usando el ensayo-t de Student de dos colas.

Se determinó la eficacia del Compuesto 80 contra tumores humanos establecidos de distintos orígenes usando xenoinjertos de Colo205 (carcinoma del

229
231

colon), SF763T (glioma) y NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células no pequeñas) (ver Tabla 6). Estos experimentos se realizaron utilizando ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ílidometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)amida (Compuesto 80), administrado oralmente a 80 mg/kg/día; una dosis que fue efectiva y bien tolerada.

TABLA 6

	Tipo de Tumor	Volumen Tumor Inicial (mm ³)	% Inhibición (día)	Valor P
A431 ¹	Epidermoide	100	93 (40)	0,002
A431 ¹	Epidermoide	400	84 (36)	0,001
Colo205	Colon	370	77 (54)	0,028
NCI-H460	Pulmón	300	61 (54)	0,003
SF763T	Glioma	550	53 (30)	0,001
¹ Los datos corresponden a experimentos informados en la Tabla 5.				

En los experimentos mencionados, se administró el Compuesto 80 una vez por día a 80 mg/kg en un vehículo a base de Cremoforo, una vez que los tumores alcanzaron el tamaño indicado. La inhibición porcentual, comparada con el grupo control tratado con el vehículo, se calculó al terminar los experimentos. Se calcularon los valores P, comparando los tamaños de los tumores de los animales que habían sido tratados con el Compuesto, con los tamaños de los tumores de los animales que habían sido tratados con el vehículo, usando el ensayo-t de Student de dos colas.

Aunque el ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)amida (Compuesto 80) inhibió el crecimiento de todos los tipos de tumores indicados en la Tabla 7, hubo una diferencia en la respuesta de los distintos modelos de xenoinjerto. Específicamente, el crecimiento de los tumores NCI-H460 y SF763T se detuvo o disminuyó notablemente, mientras que los tumores Colo205, al igual que los tumores A431, hicieron una regresión cuando fueron tratados con ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)amida.

Para determinar la base molecular para la diferencia en la respuesta entre modelos de xenoinjerto, se estudiaron los tumores SF763T. Por lo tanto, los tumores SF763T, los cuales respondieron menos al tratamiento con ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)amida, se han evaluado en el nivel molecular utilizando técnicas inmunohistológicas para determinar el efecto del tratamiento con el Compuesto. Estos estudios se efectuaron inicialmente en este tipo de tumor, porque los tumores SF763T están muy vascularizados con microvasos que expresan significativamente el marcador celular del endotelio CD31, por lo tanto, son muy apropiados para los estudios de densidad de tumores de microvasos (MVD). La evaluación inmunohistológica de tumores SF763T indicó que los tumores de animales tratados habían reducido la MVD, comparado con los controles tratados con vehículos, lo que es compatible con un mecanismo antiangiogénico de acción para el Compuesto 80; la MVD fue $24,2 \pm 4,1$ en los animales tratados con el Compuesto 80, comparado con $39,3 \pm 5,7$ para aquéllos tratados solamente con el vehículo. Tal como fue previsto a partir de la detención del crecimiento del

tumor afín, fue evidente una marcada inhibición de la proliferación celular del tumor en los tumores tratados con el Compuesto 80. Estos tumores tenían la mitad del índice mitótico de aquéllos en tumores tratados con vehículos (datos no expresados). El efecto del Compuesto 80 en la MVD y la proliferación celular del tumor indica que el Compuesto tiene efectos antiangiogénicos y antitumorales importantes, aun en condiciones en las cuales no se produce una regresión de los tumores.

La capacidad del Compuesto 80 para inhibir la fosforilación PDGFR y la señalización *in vivo* subsiguiente también se evaluó en los tumores SF763T, los que expresan altos niveles de PDGFR β . El tratamiento de los tumores SF763T con el Compuesto 80 inhibió significativamente la fosforilación de tirosina PDGFR β en tumores SF763T establecidos. El Compuesto 80 también redujo los niveles de fosfolipasa C gamma fosforilada (activada), un indicador inmediato hacia el extremo 3' de la activación de PDGFR. Estos datos demuestran que la administración oral del Compuesto 80 provoca un efecto directo en la actividad de interés (PDGFR) en los tumores *in vivo*.

Basado sobre la demostración que la capacidad del Compuesto 80 para inhibir la señalización dependiente de VEGF en HUVECs *in vitro* fue duradera (*vide supra*), se evaluó la eficacia del compuesto cuando se administró el compuesto con poca frecuencia en el modelo de tumor Colo205. Como se muestra en la Tabla 8, 80 mg/kg (91% inhibición) y 40 mg/kg (84% inhibición) fueron eficaces cuando se administraron diariamente, pero no cuando se administraron dos veces por semana. Por el contrario, una mayor dosis del Compuesto 80 (160 mg/kg) ciertamente inhibió (52% inhibición) el crecimiento de tumores Colo205 formados cuando se administró dos veces por semana, lo que

232
234

sugiere que este compuesto puede probar su eficacia cuando se lo administra con poca frecuencia a una mayor dosis. Se debe notar que los especialistas en el arte pueden determinar regímenes de dosificación, sin demasiada experimentación.

TABLA 7

Dosis (mg/kg)	Frecuencia	% Inhibición	Valor P
160	Dos veces por semana	52	0,085
	Una vez por semana	17	NS
80	Diariamente	91	0,039
	Dos veces por semana	19	NS
	Una vez por semana	0	NS
40	Diariamente	84	0,028
	Dos veces por semana	36	NS
NS: no significativo (P >0,05)			

En resumen, los resultados indicados en la Tabla 7 se obtuvieron usando células Colo205 ($0,5 \times 10^8$ células/ratón) que se habían implantado SC en la región de la ijada posterior de ratones atímicos. La administración oral del Compuesto 80 de acuerdo con el programa establecido comenzó cuando los tumores alcanzaron 400 mm^3 . Se midieron los tumores usando calibres de nonio, y se calculó el volumen del tumor como el producto de longitud x ancho x altura. Se calcularon los valores P comparando el tamaño de los tumores para los animales que fueron tratados con el Compuesto 80 ($n=8$), con los de animales que fueron tratados con un vehículo el último día del experimento, usando el ensayo-t de Student de dos colas.

232
235

II. Eficacia del Compuesto 80 en un Modelo de Enfermedad Diseminada

Además de promover el crecimiento sostenido de tumores primarios sólidos, la angiogénesis también es un componente esencial que favorece el desarrollo de enfermedades diseminadas debido a la metástasis del tumor primario. El efecto del Compuesto 80 en el desarrollo de enfermedades diseminadas se examinó en el modelo de colonización pulmonar del melanoma de ratón B16-F1. En este modelo, las células B16-F1 que se inocularon intravenosamente a través de la vena de la cola de ratones atímicos colonizaron los pulmones y formaron tumores. Como se muestra en la Tabla 8, la administración oral del Compuesto 80 a 80 mg/kg/día redujo efectivamente la carga de las células B16-F1 en el pulmón, como se evaluó por mediciones de peso pulmonar total. Estos datos sugieren que el Compuesto 80 puede inhibir enfermedades diseminadas *in vivo*.

TABLA 8

	Peso pulmonar (g)	% Inhibición	Valor P
Vehículo	0,83 ± 0,07	-	-
Compuesto ¹	0,41 ± 0,04	50	<0,001
¹ Compuesto 80			

En resumen, los resultados mostrados en la Tabla 8 se obtuvieron usando ratones atímicos que habían sido inoculados con células del tumor B16-F1 (5x10⁵ células/ratón) a través de la vena de la cola. Los ratones se trataron diariamente con el Compuesto 80 administrado oralmente, a 80 mg/kg/día (n=10) o un vehículo (n=18) durante 24 días después de la inoculación de las células tumorales. Al terminar el periodo de tratamiento, se sacrificaron los ratones y sus

pulmones se removieron y se pesaron. Se calculó la inhibición porcentual, comparando el peso pulmonar de los animales tratados con el Compuesto 80, con el peso pulmonar de los animales tratados solamente con el vehículo. Se determinó el Valor Ps usando el ensayo-t de Student de dos colas

D. Ejemplos de Actividad Biológica.

Los Ejemplos de la potencia *in vitro* de los compuestos de la presente invención se indican en la Tabla 2.

CONCLUSIÓN

En los estudios para investigar las características farmacocinéticas de los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención, se ha demostrado que la administración oral de una sola dosis de dichos compuestos resultó en una alta biodisponibilidad oral en los ratones. La buena biodisponibilidad oral y la farmacocinética lineal indican que los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención tienen características farmacocinéticas favorables.

Además, los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención son inhibidores potentes de la actividad de la tirosinquinasa del dominio de quinasa dividida RTK Fik-1/KDR y PDGFR, los cuales están involucrados en la angiogénesis, y el kit-c RTK, un receptor para el factor celular capilar (stem) (SCF), que está involucrado en ciertos cánceres hematológicos. A mayores concentraciones, los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención también inhiben la actividad de la tirosinquinasa de FGFR-1, un tercer RTK involucrado en la angiogénesis. Lo que es compatible con su actividad bioquímica, los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención inhiben la fosforilación de tirosina dependiente del ligando del RTK de

interés, y la respuesta mitogénica *in vitro* de las células humanas del endotelio de la vena umbilical (HUVECs), estimuladas con VEGF o FGF; de las células NIH-3T3 que expresan PDGFR, estimuladas con PDGF, y de las células de leucemia de mielóide aguda MO7E, estimuladas con SCF. Por el contrario, los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención no inhiben directamente la proliferación de células tumorales en un medio de crecimiento completo, salvo a concentraciones de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor las requeridas para inhibir las respuestas mitogénicas dependientes del ligando. En estudios de xenoinjerto de ratón, los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención inhibieron el crecimiento de tumores humanos establecidos de diversos orígenes en forma dependiente de la dosis y a concentraciones que fueron bien toleradas, aun ante una dosificación prolongada (>100 días). A 80 mg/kg/día, los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención indujeron la regresión de grandes tumores A431 y Colo205 formados, y provocaron una inhibición o estasis sustancial del crecimiento de tumores SF763T y NCI-H460. En ratones con tumores SF763T, los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención provocaron reducciones en la densidad de los microvasos, la fosforilación de PDGFR en los tumores y el índice mitótico en las células tumorales. A esta dosis, los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención también inhibieron la colonización pulmonar de células tumorales B16-F1 en un modelo de metástasis de tumor. Los estudios de régimen demostraron que los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención son más eficaces cuando son administrados diariamente. La prueba directa de la actividad antiangiogénica de los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención se detectó en tumores SF763T, en los cuales

se redujo la densidad de los microvasos. La prueba directa que los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención inhiben la fosforilación de PDGFR y la señalización *in vivo* también se obtuvo en tumores SF763T.

Tomados en conjunto, estos datos convalidan la noción que los compuestos de las realizaciones preferidas de la presente invención, administrados oralmente, son agentes antiangiogénicos para el tratamiento de cánceres, que incluyen tumores sólidos y tumores malignos hematológicos, en los cuales la angiogénesis y/o señalización por un kit-c son importantes en la patología de la enfermedad.

Se comprobará que los compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas de la presente invención son efectivos para modular la actividad PK; por lo tanto, se prevé que serán efectivos como agentes terapéuticos contra trastornos vinculados con RTK, CTK y STK.

Cualquier especialista en el arte también comprobará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo sus objetos y obtener los fines y las ventajas mencionados, así como aquéllos implícitos en ella. Los complejos moleculares y los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas, y compuestos, descritos en la invención, que representan ahora las realizaciones preferidas, son a modo de ejemplo, y no pretender limitar el alcance de la invención. Las modificaciones y otros usos considerados por los especialistas en el arte, que estarán comprendidos por los principios de la invención, son definidos por el campo de las reivindicaciones.

Los especialistas en el arte comprenderán fácilmente que se podrán efectuar otras substituciones y modificaciones a la invención, descrita en la presente, sin apartarse de los principios y del campo de la invención.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la descripción indican los niveles de los especialistas en el arte al cual corresponde la invención. Todas las patentes y publicaciones se incorporan en la presente por referencia, en la misma medida que si se hubiera indicado específica e individualmente que cada publicación individual sea incorporada por referencia.

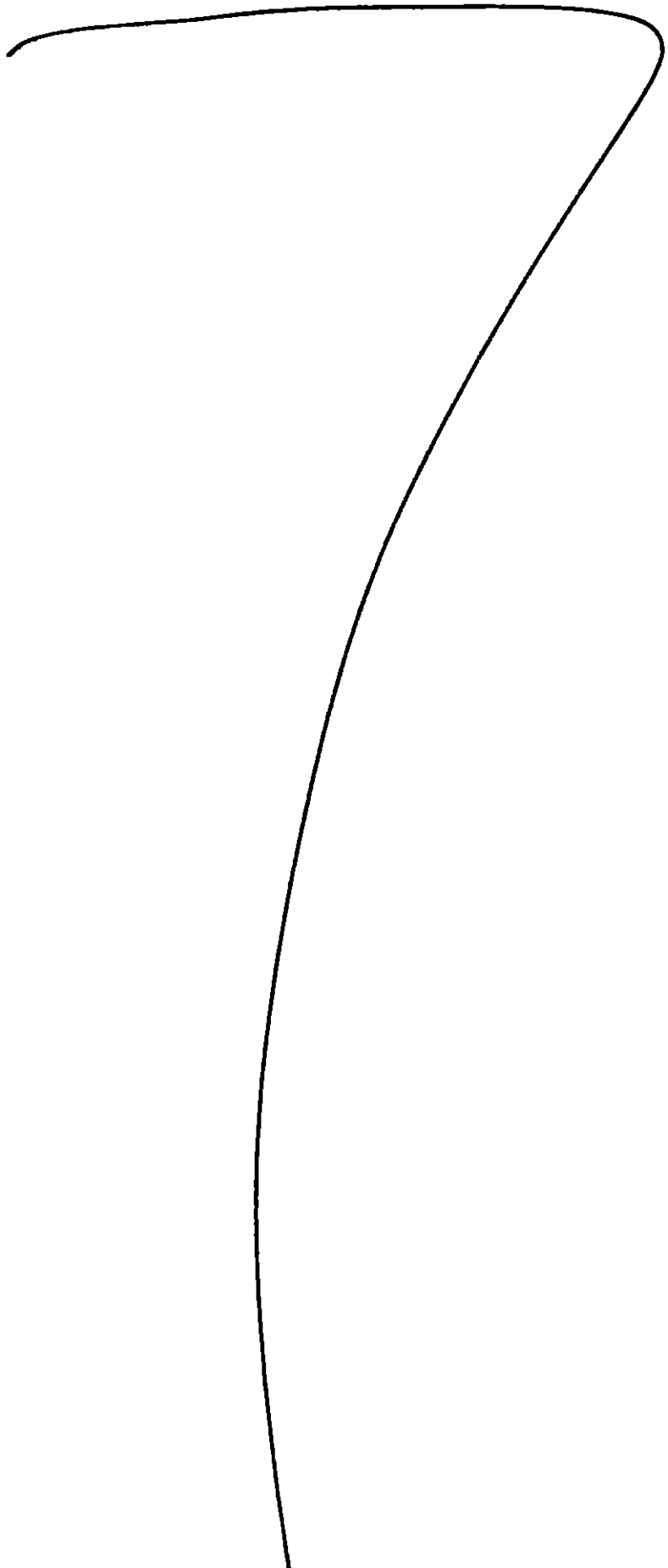
La invención descrita a modo ilustrativo se puede implementar apropiadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no estén explicados específicamente en la invención. De este modo, por ejemplo, en cada caso en la invención, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente de" y "que consiste en", puede ser reemplazado por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y las expresiones que se han empleado son utilizados a modo de descripción y no son limitativos, y no se prevé que el uso de dichos términos y dichas expresiones excluya cualquier equivalente de las funciones demostradas y explicadas, o partes de las mismas, pero se admite que diversas modificaciones son posibles dentro del campo de la invención reivindicada. Entonces, se entenderá que, aunque la presente invención ha sido explicada específicamente por realizaciones preferidas y funciones opcionales, los especialistas en el arte pueden hacer modificaciones y variaciones de los conceptos descritos en la presente, y dichas modificaciones y variaciones son consideradas como pertenecientes al campo de la presente invención, definida por las siguientes reivindicaciones.

Además, cuando las funciones o los aspectos de la invención son descritos en términos de grupos de Markush, los especialistas en el arte reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush. Por ejemplo, si X es descrito como

238
240

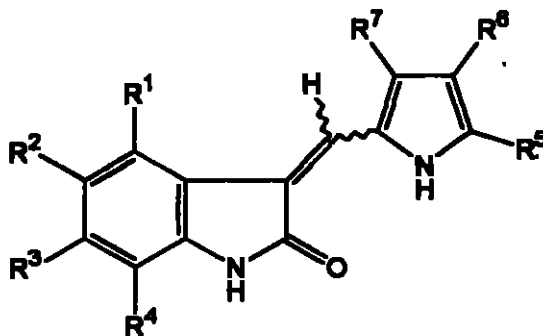
seleccionado del grupo consistente en bromo, cloro y yodo, las reivindicaciones para X que es bromo y las reivindicaciones para X que es bromo y cloro son descritas completamente.

Otras realizaciones son comprendidas por las siguientes reivindicaciones.



REIVINDICACIONES

1. Un compuesto CARACTERIZADO PORQUE tiene la fórmula (I):



(I)

donde:

R^1 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclico, hidroxí, alcoxi, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_nR^{18}$ y $-C(O)NR^9R^9$;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alquilo, trihalometilo, hidroxí, alcoxi, ciano, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, alquilo, trihalometilo, hidroxí, alcoxi, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, arilo, heteroarilo, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-NR^{13}C(O)OR^{14}$ y $-SO_2R^{20}$ (donde R^{20} es alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo y heteroaralquilo);

R^4 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, alquilo, hidroxí, alcoxi y $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y $-C(O)R^{10}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y $-C(O)R^{10}$;

242
240

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, $-C(O)R^{17}$ y $-C(O)R^{10}$; o

R^6 y R^7 se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo formado por $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_5$ y $-(CH_2)_6$;

con la condición de que al menos uno de R^5 , R^6 o R^7 debe ser

$-C(O)R^{10}$;

R^8 y R^9 se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo y arilo;

R^{10} se selecciona del grupo formado por hidroxil, alcoxi, ariloxi, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$, y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo;

R^{12} se selecciona del grupo formado por $-NR^{13}R^{14}$, hidroxil, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, $-N^+(O)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$, y

$-NHC(O)R^a$ (donde R^a es insustituido alquilo, haloalquilo, o aralquilo);

R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, cianoalquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo; o

R^{13} y R^{14} se pueden combinar para formar un grupo heterociclo;

R^{15} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, hidroxil, alcoxi y ariloxi;

R^{16} se selecciona del grupo formado por hidroxil,

$-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ y $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} se selecciona del grupo formado por alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo;

R^{20} es alquilo, arilo, aralquilo o heteroarilo; y

n y r son independientemente 1, 2, 3, o 4;

o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

2.

El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE :

R^1 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxí, alcoxi, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_nR^{18}$ y $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halo, alquilo, trihalometilo, hidroxí, alcoxi, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, alquilo, trihalometilo, hidroxí, alcoxi, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, arilo, heteroarilo, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, and $-NR^{13}C(O)OR^{14}$;

R^4 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, halógeno, alquilo, hidroxí, alcoxi y $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y $-C(O)R^{10}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y $-C(O)R^{10}$;

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, $-C(O)R^{17}$ y $-C(O)R^{10}$;

R^6 y R^7 se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo formado por $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_6-$ y $-(CH_2)_8-$;

con la condición de que al menos uno de R^5 , R^6 o R^7 debe ser $-C(O)R^{10}$;

R^8 y R^9 se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo y arilo;

R^{10} se selecciona del grupo formado por hidroxí, alcoxi, ariloxi, $-N(R^{11})(CH_2)_mR^{12}$ y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo;

242
244

R^{12} se selecciona del grupo formado por $-NR^{13}R^{14}$, hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, arilo y heteroarilo;

R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo;

R^{13} y R^{14} se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo formado por $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$, y $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$;

R^{15} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, hidroxilo, alcoxi y arilo;

R^{16} se selecciona del grupo formado por hidroxilo, $-C(O)R^{18}$, $-NR^{13}R^{14}$ y $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} se selecciona del grupo formado por alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo; n y r son independientemente 1, 2, 3, o 4;

o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

3. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido;

n es 2 o 3; y

R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} y R^{14} son independientemente alquilo inferior insustituido.

4. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido;

n es 2 o 3; y

R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} y R^{14} se combinan para formar un grupo seleccionado entre $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O-(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

243
245

5. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es N-
(2-dimetilamino-etil)aminocarbonilo, N-(2-dietilaminoetil)-N-metil-aminocarbonilo,
N-(3-dimetilaminopropil)aminocarbonilo, N-(2-dietilaminoetil)aminocarbonilo, N-(3-
etilaminopropil)-aminocarbonilo, N-(2-etilaminoetil)aminocarbonilo, o N-(3-
dietilaminopropil)aminocarbonilo.

6. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es N-
(2-dietil-aminoetil)aminocarbonilo o N-(2-etilaminoetil)amino-carbonilo.

7. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es 3-
pirrolidin-1-ilpropilaminocarbonilo, 3-morfolin-4-ilpropilamino-carbonilo, 2-
pirrolidin-1-iletilaminocarbonilo, 2-morfolin-4-il-etilaminocarbonilo, 2-(4-
metilpiperazin-1-il)etil-aminocarbonilo, 2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etil-
aminocarbonilo, 3-(4-metilpiperazin-1-il)propilamino-carbonilo o 3-(3,5-
dimetilpiperazin-1-il)propilamino-carbonilo.

8. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6
es $-\text{COR}^{10}$ donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido;

n es 2 o 3; y

R^{12} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ donde R^{13} y R^{14} son independientemente alquilo inferior
insustituido. # átomos

9. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6
es $-\text{COR}^{10}$ donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido;

alquilo

n es 2 o 3; y

R^{12} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ donde R^{13} y R^{14} se combinan para formar un grupo seleccionado
entre $-(\text{CH}_2)_4-$, $-(\text{CH}_2)_5-$, $-(\text{CH}_2)_2\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ o $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2-$.

244
246

10. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es N-(2-dimetilamino-etil)aminocarbonilo, N-(2-dietil-aminoetil)-N-metilaminocarbonilo, N-(3-dimetilamino-propil)-aminocarbonilo, N-(2-dietilaminoetil)-aminocarbonilo, N-(2-etilaminoetil)-aminocarbonilo, N-(3-etilaminopropil)-aminocarbonilo, o N-(3-dietilamino-propil)aminocarbonilo.

11. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es N-(2-dietilaminoetil)aminocarbonilo o N-(2-etilamino-etil)aminocarbonilo.

12. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es 3-pirrolidin-1-ilpropilaminocarbonilo, 3-morfolin-4-ilpropilamino-carbonilo, 2-pirrolidin-1-iletilamino-carbonilo, 2-morfolin-4-iletilaminocarbonilo, 2-(4-metilpiperazin-1-il)etil-aminocarbonilo, 2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etil-aminocarbonilo, 3-(4-metilpiperazin-1-il)propilamino-carbonilo o 3-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)propilamino-carbonilo. heterocíclico

13. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo inferior sustituido con hidroxí, arilo, heteroalíclico, heteroarilo, o carboxi.

14. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es 3-triazin-1-ilpropilaminocarbonilo, 2-triazin-1-iletilaminocarbonilo, 3-imidazol-1-ilpropilaminocarbonilo, piridin-4-ilmetil-aminocarbonilo, 2-piridin-2-iletilaminocarbonilo o 2-imidazol-1-il etilaminocarbonilo.

15. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo inferior sustituido con hidroxí, arilo, heteroalíclico, heteroarilo, o carboxi.

16. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es 2-triazin-1-ilpropilaminocarbonilo, 2-triazin-1-iletilaminocarbonilo, 3-imidazol-1-

ilpropilaminocarbonilo, piridin-4-ilmetil-aminocarbonilo, 2-piridin-2-iletilaminocarbonilo o 2-imidazol-1-ilo etilaminocarbonilo.

17. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es $-\text{COR}^{10}$ donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde: > comp ley. dard.
 R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido;

n es 2 o 3; y

R^{12} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo.

18. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es $-\text{COR}^{10}$ donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido;

n es 2 o 3; y

R^{12} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo de 5, 6 o 7 átomos que contiene un grupo carbonilo y uno o dos átomos de nitrógeno dentro del anillo.

19. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es 2-(3-oxopiperazin-1-il)etilaminocarbonilo, 2-(imidazolidin-1-il-2-ona)etilaminocarbonilo, 2-(tetrahidropirimidin-1-il-2-ona)etilaminocarbonilo, 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-etilaminocarbonilo, 3-(3-oxopiperazin-1-il)propil-aminocarbonilo, 3-(imidazolidin-1-il-2-ona)propil-aminocarbonilo, 3-(tetrahidropirimidin-1-il-2-ona)-propilaminocarbonilo, o 3-(2-oxopirrolidin-1-il)propil-aminocarbonilo.

20. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es $-\text{COR}^{10}$ donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido;

n es 2 o 3; y

R^{12} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo.

2146
288

21. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior insustituido;

n es 2 o 3; y

R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo de 5, 6 o 7 átomos que contiene un grupo carbonilo y uno o dos átomos de nitrógeno dentro del anillo.

22. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es 2-(3-oxopiperazin-1-il)etilaminocarbonilo, 2-(imidazolidin-1-il-2-ona)etilaminocarbonilo, 2-(tetrahidropirimidin-1-il-2-ona)etilaminocarbonilo, 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-etilaminocarbonilo, 3-(3-oxopiperazin-1-il)propil-aminocarbonilo, 3-(imidazolidin-1-il-2-ona)propil-aminocarbonilo, 3-(tetrahidropirimidin-1-il-2-ona)-propilaminocarbonilo, o 3-(2-oxopirrolidin-1-il)propil-aminocarbonilo.

23. El compuesto o sal de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, 13-14 o 17-19 CARACTERIZADO PORQUE :

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior insustituido; y

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y -C(O)R¹⁷ donde R^{17} es hidroxí, alquilo inferior insustituido o arilo.

24. El compuesto o sal de la reivindicación 23 CARACTERIZADO PORQUE:

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, y metilo; y

R^7 se selecciona del grupo formado por metilo, hidrógeno y fenilo.

25. El compuesto o sal de cualquiera de las reivindicaciones 8-12, 15, 16, o 20-22 CARACTERIZADO PORQUE :

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior insustituido; y

247
249

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-C(O)R^{17}$, donde R^{17} es hidroxil, alquilo inferior insustituido o arilo.

(26.) El compuesto o sal de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE:

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, o metilo; y

R^7 se selecciona del grupo formado por metilo, hidrógeno o fenilo.

(27.) El compuesto o sal de la reivindicación 23 CARACTERIZADO PORQUE:

R^1 es hidrógeno, alquilo inferior insustituido, $-C(O)NR^8R^9$, insustituido cicloalquilo o arilo;

R^2 es hidrógeno, halo, alcoxi inferior, ciano, arilo, o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo; R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo formado por alquilo inferior, halo, o alcoxi inferior, y heteroarilo; y

R^4 es hidrógeno.

(28.) El compuesto o sal de la reivindicación 23 CARACTERIZADO PORQUE :

R^1 es hidrógeno o fenilo;

R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, fluoro, metoxi, etoxi, fenilo, ciano, dimetilaminosulfonilo, 3-clorofenil-aminosulfonilo, carboxi, metoxi, aminosulfonilo, metilaminosulfonilo, metilsulfonilo etilsulfonilo, bencilsulfonilo, fenilaminosulfonilo, piridin-3-il-aminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, o isopropilamino-sulfonilo;

R^3 es hidrógeno, metoxi, carboxi, fenilo, piridin-3-ilo, 3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-isopropilfenilo, 4-n-butilfenilo, o 3-isopropilfenilo; y

R^4 es hidrógeno.

(29.) El compuesto o sal de la reivindicación 23 CARACTERIZADO PORQUE :

R^1 es hidrógeno;

248
250

R^2 es hidrógeno, ciano, fluoro, cloro, o bromo;

R^3 es hidrógeno; y

R^4 es hidrógeno.

30. El compuesto o sal de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE :

R^1 es hidrógeno, alquilo inferior insustituido, $-C(O)NR^8R^9$, insustituido cicloalquilo o arilo;

R^2 es hidrógeno, halo, alcoxi inferior, ciano, arilo, $-SO_2R^{20}$, o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo y heteroarilo; y

R^4 es hidrógeno.

31. El compuesto o sal de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE :

R^1 es hidrógeno o fenilo;

R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, fluoro, metoxi, etoxi, fenilo, dimetilaminosulfonilo, ciano, metilsulfonilo, etilsulfonilo, bencilsulfonilo, 3-clorofenil-aminosulfonilo, carboxi, metoxi, aminosulfonilo, metilaminosulfonilo, fenilaminosulfonilo, piridin-3-il-aminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, o isopropilamino-sulfonilo;

R^3 es hidrógeno, metoxi, carboxi, fenilo, piridin-3-ilo, 3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-isopropilfenilo, 4-n-butilfenilo, 3-isopropilfenilo; y

R^4 es hidrógeno.

32. El compuesto o sal de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE:

R^1 es hidrógeno;

R^2 es hidrógeno, ciano, fluoro, cloro, o bromo;

R^3 es fenilo; y

R^4 es hidrógeno.

33. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE :

R^1 es hidrógeno, alquilo inferior insustituido, $-C(O)NR^6R^9$, cicloalquilo insustituido o arilo;

R^2 es hidrógeno, halo, alcoxi inferior, ciano, arilo o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo, y heteroarilo; y

R^4 es hidrógeno.

34. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE :

R^1 es hidrógeno, o metilo;

R^2 es hidrógeno, ciano, cloro, fluoro, o bromo;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno o fenilo; y

R^4 es hidrógeno.

35. El compuesto o sal de la reivindicación 33 o 34 CARACTERIZADO PORQUE :

R^5 es $-COR^{10}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior insustituido; y

R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-C(O)R^{17}$ donde R^{17} es hidroxil, alquilo inferior insustituido o arilo.

36. El compuesto o sal de la reivindicación 33 o 34 CARACTERIZADO PORQUE :

R^6 es $-COR^{10}$;

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo inferior

insustituido; y

R⁷ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y -C(O)R¹⁷ donde R¹⁷ es hidróxi, alquilo inferior insustituido o arilo.

37. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R⁵ es -COR¹⁰ donde R¹⁰ es -NR¹³R¹⁴ donde R¹³ es hidrógeno y R¹⁴ es alquilo inferior sustituido con hidróxi, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, carboxi, o -NR¹⁸R¹⁹ donde R¹⁸ y R¹⁹ son independientemente hidrógeno o alquilo inferior insustituido.

38. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R⁵ es 2-[(diethylamino)-2-hydroxyethyl]aminocarbonilo, 2-(N-ethyl-N-2-hydroxyethylamino)ethylaminocarbonilo, carboxymethylamino-carbonilo, o 2-hydroxyethylamino-carbonilo.

39. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R⁶ es -COR¹⁰ donde R¹⁰ es -NR¹³R¹⁴ donde R¹³ es hidrógeno y R¹⁴ es alquilo inferior sustituido con hidróxi, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, carboxi, o -NR¹⁸R¹⁹ donde R¹⁸ y R¹⁹ son independientemente hidrógeno o alquilo inferior insustituido.

40. El compuesto o sal de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R⁶ es [2-(diethylamino)-2-hydroxy]ethylaminocarbonilo, 2-(N-ethyl-N-2-hydroxyethylamino)ethylaminocarbonilo, carboxymethylaminocarbonilo, o 2-hydroxyethylaminocarbonilo.

41. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R⁵ es -COR¹⁰ donde R¹⁰ es -NR¹¹(CH₂)_nR¹² donde R¹² es -N⁺(O)NR¹³R¹⁴ o -N(OH)R¹³ donde R¹³ y R¹⁴ se seleccionan independientemente del grupo formado por alquilo inferior insustituido.

257
253

42. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^5 es 2-(N-hidroxi-N-etilamino)etilaminocarbonilo o 2-[N⁺(O)(C₂H₅)₂]etil-aminocarbonilo.

43. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es -COR¹⁰ donde R^{10} es -NR¹¹(CH₂)_nR¹² donde R^{12} es -N⁺(O)NR¹³R¹⁴ o -N(OH)R¹³ donde R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por alquilo inferior insustituido,

44. El compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE R^6 es 2-(N-hidroxi-N-etilamino)etilaminocarbonilo o 2-[N⁺(O)(C₂H₅)₂]etil-aminocarbonilo.

45. El compuesto o sal de la reivindicación 37, 38, 41 o 42 CARACTERIZADO PORQUE :

R^6 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, o metilo; y

R^7 se selecciona del grupo formado por metilo, hidrógeno o fenilo.

46. El compuesto o sal de cualquiera de las reivindicaciones 39, 40, 43, 44 o 20-22 CARACTERIZADO PORQUE :

R^5 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, o metilo; y

R^7 se selecciona del grupo formado por metilo, hidrógeno o fenilo.

47. El compuesto o sal de la reivindicación 45 CARACTERIZADO PORQUE:

R^1 es hidrógeno;

R^2 es hidrógeno, ciano, cloro, fluoro, o bromo;

R^3 es hidrógeno; y

R^4 es hidrógeno.

48. El compuesto o sal de la reivindicación 46 CARACTERIZADO PORQUE:

R^1 es hidrógeno;

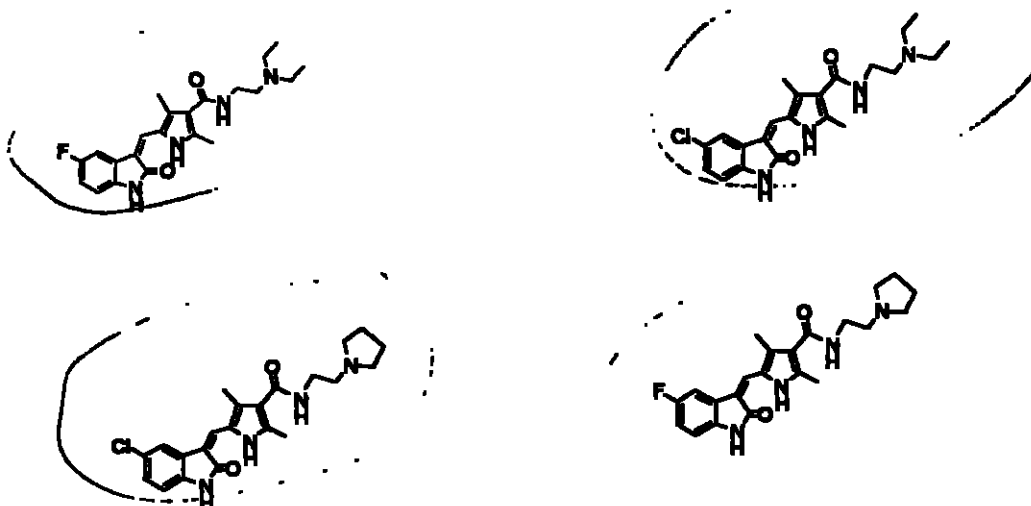
R^2 es ciano, cloro, fluoro, o bromo;

R^3 es hidrógeno; y

252
254

R^4 es hidrógeno.

49. El compuesto o sal de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto es seleccionado del grupo formado por:



o una sal de L-malato del mismo.

50. Una composición farmacéutica, CARACTERIZADA PORQUE comprende un compuesto o sal de la reivindicación 1 y un vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

51. Una composición farmacéutica, CARACTERIZADA PORQUE comprende un compuesto o sal de la reivindicación 49 y un vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

52. Un método para la modulación de la actividad catalítica de una proteinquinasa CARACTERIZADO PORQUE comprende poner en contacto dicha proteinquinasa con un compuesto o sal de la reivindicación 1 o 49.

53. El método de la reivindicación 52 CARACTERIZADO PORQUE dicha proteinquinasa se selecciona del grupo formado por un receptor de tirosinquinasa, un no receptor de tirosinquinasa y una serin-tirosinquinasa.

54. Un método para tratar o prevenir una afección relacionada con la proteinquinasa en un organismo CARACTERIZADO PORQUE comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos de una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal de la reivindicación 50 o Reivindicación 51 y un vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico a dicho organismo.

55. El método de la reivindicación 54 CARACTERIZADO PORQUE dicha afección relacionada con la proteinquinasa se selecciona del grupo formado por una afección relacionada con un receptor de tirosinquinasa, una afección relacionada con un no receptor de tirosinquinasa y una afección relacionada con una serín-tirosinquinasa.

56. El método de la reivindicación 54 CARACTERIZADO PORQUE dicha afección relacionada con una proteinquinasa se selecciona del grupo formado por una afección relacionada con los EGFR, una afección relacionada con los PDGFR, una afección relacionada con los IGFR y una afección relacionada con los FLK.

57. El método de la reivindicación 54 CARACTERIZADO PORQUE dicha afección relacionada con la proteinquinasa es un cáncer seleccionado del grupo formado por carcinoma de células escamosas, astrocitoma, sarcoma de Kaposi, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de células pequeñas de pulmón, glioma, cáncer colorectal, cáncer genitourinario y cáncer gastrointestinal.

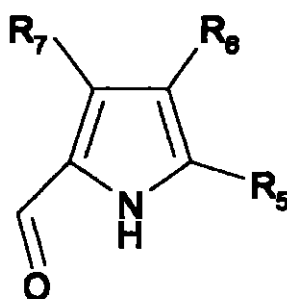
58. El método de la reivindicación 54 CARACTERIZADO PORQUE dicha afección relacionada con la proteinquinasa se selecciona del grupo formado por

FLK : receptor de tirosin quinasa
 IGFR: receptor del factor de crecimiento insulínico
 EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
 PDGFR : receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta

diabetes, un trastorno autoinmune, un trastorno hiperproliferativo, restenosis, fibrosis, psoriasis, enfermedad de von Heppel-Lindau, osteoartritis, artritis reumatoide, angiogenesis, un trastorno inflamatorio, una enfermedad inmunológica y una enfermedad cardiovascular.

59. El método de la reivindicación 54 CARACTERIZADO PORQUE dicho organismo es un ser humano.

60. Un intermediario CARACTERIZADO PORQUE tiene la Fórmula (II):



(II)

donde:

R⁵ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y -C(O)R¹⁰;

R⁶ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y -C(O)R¹⁰;

R⁷ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, -C(O)R¹⁷ y -C(O)R¹⁰;

R⁶ y R⁷ se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo formado por -(CH₂)₄-, -(CH₂)₅- y -(CH₂)₆-;

con la condición de que al menos uno de R⁵, R⁶ o R⁷ debe ser -C(O)R¹⁰;

R¹⁰ se selecciona del grupo formado por hidroxí, alcoxi, ariloxi, -

253
257

R^{11} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo;

R^{12} se selecciona del grupo formado por $-NR^{13}R^{14}$, hidroxí, $-C(O)R^{15}$, arilo y heteroarilo;

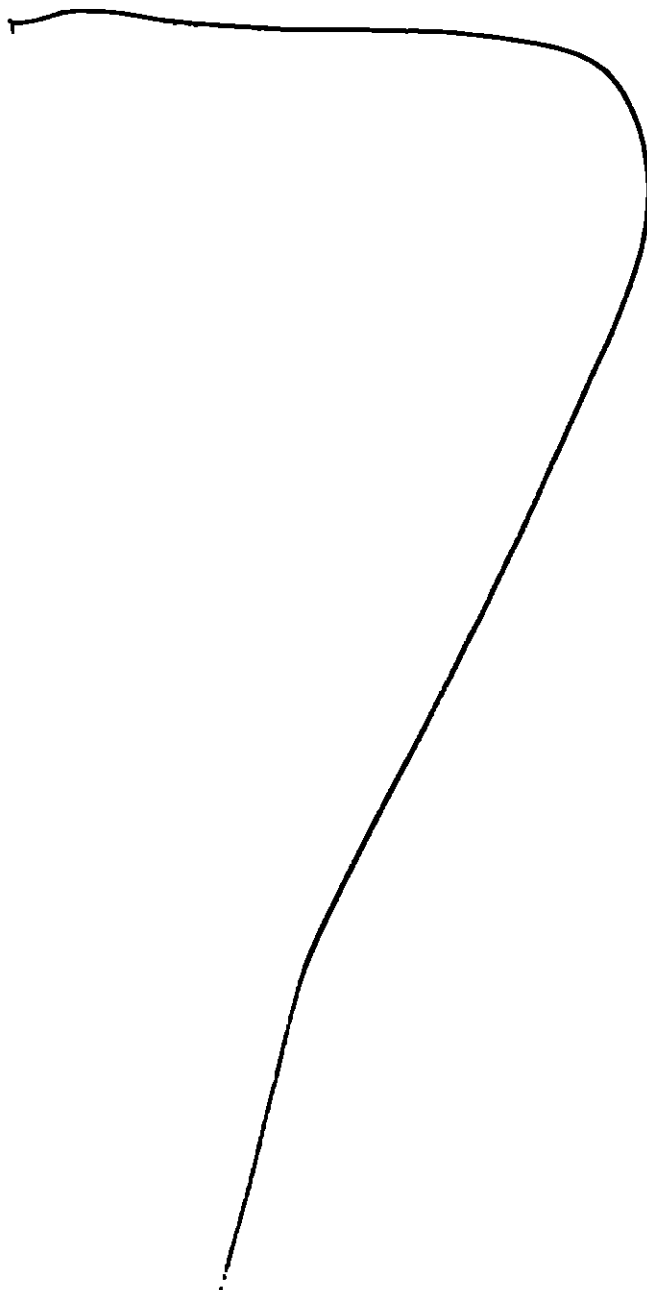
R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo, clanoalquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo; o

R^{13} y R^{14} se pueden combinar para formar un grupo heterociclo;

R^{15} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, hidroxí, alcoxi y arilo;

R^{17} se selecciona del grupo formado por alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo; y

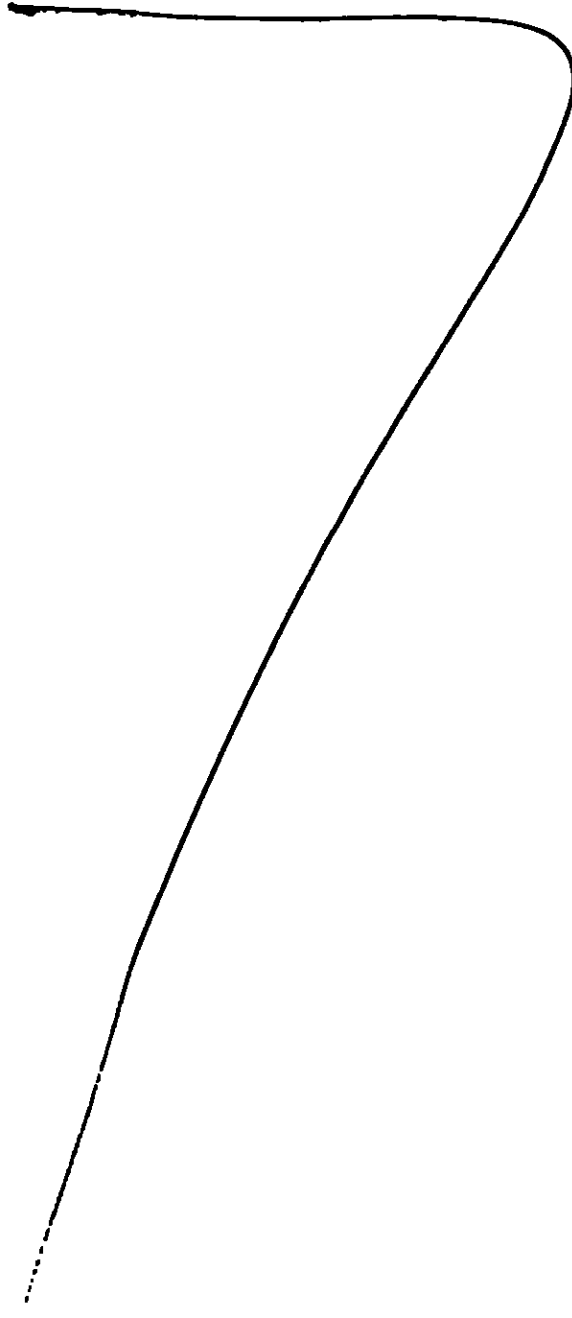
n es 1, 2, 3, o 4.



2- INDOLINONAS SUSTITUIDAS CON PIRROLES INHIBIDORAS DE PROTEINQUINASAS

RESUMEN

Compuestos de 2-indolinona sustituidas con pirroles y sus sales aceptables para uso farmacéutico que modulan la actividad de proteinquinasas y por lo tanto son útiles para la prevención y tratamiento de trastornos celulares relacionados con proteinquinasas tales como el cáncer.



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION [✓]

MODELO DE UTILIDAD []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- Descripción de la invención []
- Dibujos de ser estos pertinentes []
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas []

COMPLETA [✓]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica del esquema de trazado []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

483
Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Commutador: 334 12 21-23-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

folios 238, 239, 260
202050 De para publicació
5 2002

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

REFERENCIA:	Radicación No.	01-12088
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1295
	Folios	001

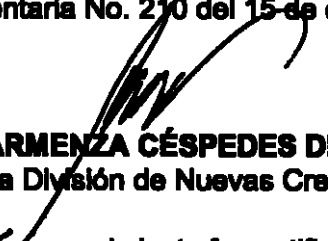
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparezca en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha

26 ABR. 2001

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de las solicitudes cuya prioridad se invoca, copia de las mismas certificadas por la autoridad que las expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia