

PET

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04012058 00000000

Folios: 415

Fecha (AMB): 2004-02-13 09:17:40

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NAC1 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Radicación : 04012058 00000000

Folios: 415

Fecha (AMB): 2004-02-13 09:17:40

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NAC1 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

04 012058 00

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I.

☒ X

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: SUGEN, INC. y PHARMACIA CORPORATION.

Dirección: 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080-4811, E.U.A. y 800 N. Lindbergh Boulevard St. Louis, MO 63141, E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio:

Lugar de Constitución: San Francisco y San Louis.

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre C, Calle 100 No. 8A-55 Piso 10.

Teléfono: 6386200

Fax: 6386201

E-Mail: filings@olarteisbeck.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒ X

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 79.782.747 Bta TP 74.295

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: JAIME MASFERRER, PARUL DOSHI, JULIE CHERRINGTON.

Dirección: 812 Courtwood Lane, Ballwin, MO 63011, E.U.A.; 16763 Hickory Crest Drive, Wildwood, MO 63011, E.U.A.
4495A 25th Street, San Francisco, CA 94114, E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: CHILENA, INDIA, ESTADOUNIDENSE.

5 PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US02/25797

Fecha Agosto 15, 2002

Publicación Internacional No. WO 03/015608

Fecha Febrero 27, 2003

6 Título (54)

TERAPIA DE COMBINACION PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER.

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 31/50

8

Prioridad

SI ☒ X

NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Agosto 15, 2001

(31) Número de Solicitud

60/312,413

9

Comprobante de pago No. 10,173

Fecha Febrero 9, 2004

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

15

For example, U.S. Patent No. 5,854,205 describes an isolated endostatin protein that is an inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis; U.S. Patent No. 5,843,925 describes a method for inhibiting angiogenesis and endothelial cell proliferation using a 7-[substituted amino]-9-[(substituted glycyloamido)-6-demethyl-6-deoxytetracycline; U.S. Patent
5 No. 5,861,372 describes the use of an aggregate endothelial inhibitor, angiostatin, and its use in inhibiting angiogenesis, PCT/GB97/00650 describes the use of cinnoline derivatives for use in the production of an antiangiogenic and/or vascular permeability reducing effect; Tai-Ping, D. describes potential anti-angiogenic therapies, see Trends Pharmacol.Sci. 16, No. 2, 57-66, 1995; Lode, H. et al. describes synergy between an antiangiogenic integrin α_v antagonist
10 and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastasis, see Proc. Nat. Acad. Sci. USA. , 96 (4), 1591-1596, 1999; Giannia, A. et al describes Integrin antagonists and other low molecular weight compounds as inhibitors of angiogenesis, see New drugs in cancer therapy. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36(6), 588-590, 1997; WO 97/41,844 describes a method of using combinations of angiostatic compounds for the prevention and/or
15 treatment of neovascularization in human patients; WO 98/22,101 describes a method of using [pyrazol-1-yl]benzenesulfonamides as anti-angiogenic agents; and US Patent 5,792,783 describes use of 3-heteroaryl-2-indolinone that are protein kinase inhibitors and antiangiogenic agents for the treatment of various cancers.

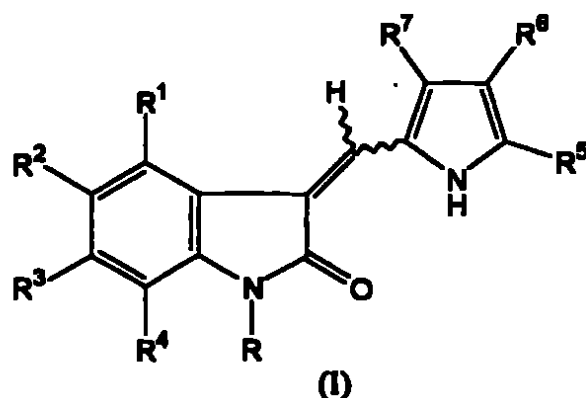
Recently, it has been reported that treatment of colorectal cancer with a
20 cyclooxygenase-2 selective inhibitor, specifically Celecoxib[®], in combination with an ART-2 inhibitor, specifically Herceptin[®], is more effective than when either agent is used alone. Accordingly, there is a need to discover new combinations of chemotherapeutic agents that when used together are more efficacious than when used alone. The present invention fulfills this need.

25

SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, this invention is directed to a method of treatment or prevention of cancers comprising administering to a mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of:

30 a protein kinase inhibitor of the Formula (I):



wherein:

R is selected from the group consisting of hydrogen, piperazin-1-ylmethyl, 4-methylpiperazin-1-ylmethyl, piperidin-1-ylmethyl, 2-hydroxymethylpyrrolidin-1-ylmethyl, 2-carboxypyrrolidin-1-ylmethyl, and pyrrolidin-1-ylmethyl;

R¹ is selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyclic, hydroxy, alkoxy, -C(O)NR⁸R⁹, -NR¹³R¹⁴, -(CO)R¹⁵, and -(CH₂)_nR¹⁶;

R² is selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, substituted alkyl, trihalomethyl, hydroxy, alkoxy, cyano, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -C(O)R¹⁵, aryl, heteroaryl, and -S(O)₂NR¹³R¹⁴;

R³ is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, substituted alkyl, trihalomethyl, hydroxy, alkoxy, aryl, heteroaryl, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³S(O)₂R¹⁴, -S(O)₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -(CO)R¹⁵, and -SO₂R¹⁹;

R⁴ is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, substituted alkyl, hydroxy, alkoxy, and -NR¹³R¹⁴;

R⁵ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and -C(O)R¹⁰;

R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and -C(O)R¹⁰;

R⁷ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, heteroaryl, -C(O)R¹⁷, and -C(O)R¹⁰ provided that when R is hydrogen then at least one of R⁵, R⁶ and R⁷ is -C(O)R¹⁰; or

R⁶ and R⁷ may combine to form a group selected from the group consisting of -(CH₂)₄-, -(CH₂)₅- and -(CH₂)₆-;

R^8 and R^9 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and aryl;

R^{10} is selected from the group consisting of hydroxy, alkoxy, aryloxy, -
 $N(R^{11})(alkylene)_nR^{12}$ wherein the alkylene group is optionally substituted with a hydroxy
 5 group, and $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, and substituted alkyl;

R^{12} is selected from the group consisting of $-NR^{13}R^{14}$, hydroxy, $-C(O)R^{15}$, aryl, heteroaryl, $-N^+(O^-)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$, and $-NHC(O)R^{18}$ (wherein R^{18} is alkyl, substituted alkyl, haloalkyl, or aralkyl);

10 R^{13} and R^{14} are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, lower alkyl substituted with hydroxyalkylamino, cyanoalkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl and heteroaryl; or

R^{13} and R^{14} may combine to form a heterocyclo group;

R^{15} is selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy, alkoxy and aryloxy;

15 R^{16} is selected from the group consisting of hydroxy, $-NR^{13}R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, and -
 $C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} is selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, aryl and heteroaryl;

20 R^{19} is selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, or heteroaralkyl; and

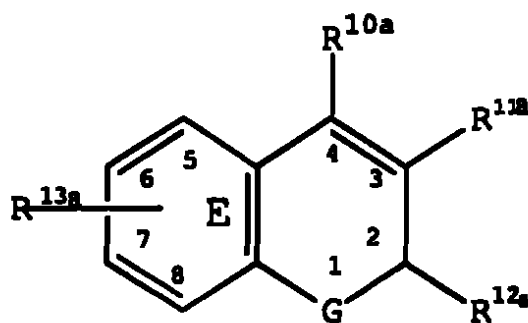
n and r are independently 1, 2, 3, or 4;

in combination with a cyclooxygenase inhibitor;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

25 Preferably, the protein kinase inhibitor of Formula (I) is used in combination with a cyclooxygenase-2 selective inhibitor selected from the group consisting of:

(i) a compound of Formula (II):



wherein:

G is selected from the group consisting of O, S, and -NR^a- wherein R^a is hydrogen or alkyl;

5 R^{10a} is selected from the group consisting of hydrogen and aryl;

R^{11a} is selected from the group consisting of carboxyl, alkyl, aralkyl, aminocarbonyl, alkylsulfonylaminocarbonyl, and alkoxycarbonyl;

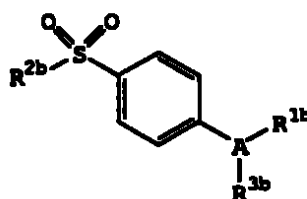
R^{12a} is selected from the group consisting of haloalkyl, alkyl, aralkyl, cycloalkyl and aryl optionally substituted with one or more radicals selected from alkylthio, nitro and

10 alkylsulfonyl; and

R^{13a} is one or more radicals independently selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, aralkyl, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy, aralkyloxy, heteroaralkyloxy, haloalkyl, haloalkoxy, alkylamino, arylamino, aralkylamino, heteroarylaminosulfonyl, heteroarylalkylamino, nitro, amino, aminosulfonyl, alkylaminosulfonyl, arylaminosulfonyl, heteroarylaminosulfonyl, aralkylaminosulfonyl, heteroaralkylaminosulfonyl, heterocyclosulfonyl, alkylsulfonyl, hydroxyarylcarbonyl, nitroaryl, optionally substituted aryl, optionally substituted heteroaryl, aralkylcarbonyl, heteroarylcarbonyl, arylcarbonyl, aminocarbonyl, and alkylcarbonyl;

or R^{13a} together with ring E forms a naphthyl ring; or

20 (ii) a compound of Formula (III):



(III)

wherein:

25 A is selected from the group consisting of partially unsaturated or unsaturated heterocyclyl and partially unsaturated or unsaturated carbocyclic rings;

R^{1b} is selected from the group consisting of heterocyclyl, cycloalkyl, cycloalkenyl and aryl, wherein R^{1b} is optionally substituted at a substitutable position with one or more radicals independently selected from alkyl, haloalkyl, cyano, carboxyl, alkoxycarbonyl, hydroxyl, hydroxyalkyl, haloalkoxy, amino, alkylamino, arylamino, nitro, alkoxyalkyl, alkylsulfinyl, halo, alkoxy, and alkylthio;

30 R^{2b} is selected from the group consisting of methyl and amino; and

20

R^{3b} is selected from the group consisting of a radical selected from hydrogen, halo, alkyl, alkenyl, alkynyl, oxo, cyano, carboxyl, cyanoalkyl, heterocycloxy, alkyloxy, alkylthio, alkylcarbonyl, cycloalkyl, aryl, haloalkyl, heterocyclyl, cycloalkenyl, aralkyl, heterocyclalkyl, acyl, alkylthioalkyl, hydroxyalkyl, alkoxycarbonyl, arylcarbonyl, aralkylcarbonyl, aralkenyl, alkoxyalkyl, arylthioalkyl, aryloxyalkyl, aralkylthioalkyl, aralkoxyalkyl, alkoxyaralkoxyalkyl, alkoxycarbonylalkyl, aminocarbonyl, aminocarbonylalkyl, alkylaminocarbonyl, N- arylaminocarbonyl, N-alkyl-N-arylaminocarbonyl, alkylaminocarbonylalkyl, carboxyalkyl, alkylamino, N-aryl amino, N-aralkyl amino, N-alkyl-N-aralkyl amino, N-alkyl-N-aryl amino, aminoalkyl, alkylaminoalkyl, N-aryl aminoalkyl, N-aralkyl aminoalkyl, N-alkyl-N-aralkyl aminoalkyl, N-alkyl-N-aryl aminoalkyl, aryloxy, aralkoxy, arylthio, aralkylthio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, aminosulfonyl, alkylaminosulfonyl, N-arylaminosulfonyl, arylsulfonyl, and N-alkyl-N-arylaminosulfonyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Preferably, the above compounds are administered as a pharmaceutical composition comprising one or more of the above compounds and a pharmaceutically acceptable excipient. Specifically, the therapeutic agents of this invention can be formulated as separate compositions which are given at the same time or different times, or the therapeutic agents can be given as a single composition.

The methods of the present invention are useful for the treatment or prevention of neoplasia disorders including acral lentiginous melanoma, actinic keratoses, adenocarcinoma, adenoid cystic carcinoma, adenomas, adenosarcoma, adenosquamous carcinoma, astrocytic tumors, bartholin gland carcinoma, basal cell carcinoma, bronchial gland carcinomas, capillary, carcinoids, carcinoma, carcinosarcoma, cavernous, cholangiocarcinoma, chondrosarcoma, choroid plexus papilloma/carcinoma, clear cell carcinoma, cystadenoma, endodermal sinus tumor, endometrial hyperplasia, endometrial stromal sarcoma, endometrioid adenocarcinoma, ependymal, epitheloid, Ewing's sarcoma, fibrolamellar, focal nodular hyperplasia, gastrinoma, germ cell tumors, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastomas, hemangioendothelioma, hemangiomas, hepatic adenoma, hepatic adenomatosis, hepatocellular carcinoma, insulinoma, intraepithelial neoplasia, interepithelial squamous cell neoplasia, invasive squamous cell carcinoma, large cell carcinoma, leiomyosarcoma, lentigo maligna melanomas, malignant melanoma, malignant mesothelial tumors, medulloblastoma, medulloepithelioma, melanoma, meningeal, mesothelial, metastatic carcinoma, mucoepidermoid carcinoma, neuroblastoma, neuroepithelial adenocarcinoma nodular melanoma, oat cell carcinoma, oligodendrogial, osteosarcoma, pancreatic polypeptide,

papillary serous adenocarcinoma, pineal cell, pituitary tumors, plasmacytoma, pseudosarcoma, pulmonary blastoma, renal cell carcinoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, serous carcinoma, small cell carcinoma, soft tissue carcinomas, somatostatin-secreting tumor, squamous carcinoma, squamous cell carcinoma, submesothelial, superficial spreading
5 melanoma, undifferentiated carcinoma, uveal melanoma, verrucous carcinoma, vipoma, well differentiated carcinoma, and Wilm's tumor.

The methods of the present invention provide one or more benefits. One of the benefits is that the compositions, agents and therapies of the present invention are administered in combination at a low dose, that is, at a dose lower than has been conventionally used in clinical
10 situations for each of the individual components administered alone.

A benefit of lowering the dose of the compounds, compositions, agents and therapies of the present invention administered to a mammal includes a decrease in the incidence of adverse effects associated with higher dosages. For example, by lowering the dosage of a
15 chemotherapeutic agent such as methotrexate, a reduction in the frequency and the severity of nausea and vomiting will result when compared to that observed at higher dosages. Similar benefits are contemplated when a protein kinase inhibitor of the present invention is used in combination with a cyclooxygenase inhibitor, in particular a cyclooxygenase-2 selective inhibitor.

By lowering the incidence of adverse effects, an improvement in the quality of life of a
20 patient undergoing treatment for cancer is contemplated. Further benefits of lowering the incidence of adverse effects include an improvement in patient compliance, a reduction in the number of hospitalizations needed for the treatment of adverse effects, and a reduction in the administration of analgesic agents needed to treat pain associated with the adverse effects.

Another benefit that is contemplated is that the inhibition of the tumors is greater when
25 a protein kinase inhibitor is administered in combination with a cyclooxygenase inhibitor, preferably a cyclooxygenase-2 selective inhibitor than when either of these agents are administered alone.

21

The present invention further includes kits comprising a COX-2 inhibitor and a protein kinase inhibitor of Formula (I).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5

Definitions

Unless otherwise stated the following terms used in the specification and claims have the meanings discussed below:

"Alkyl" refers to a saturated aliphatic hydrocarbon radical including straight chain and branched chain groups of 1 to 20 carbon atoms (whenever a numerical range; e.g. "1-20", is stated herein, it means that the group, in this case the alkyl group, may contain 1 carbon atom, 2 carbon atoms, 3 carbon atoms, etc. up to and including 20 carbon atoms). Alkyl groups containing from 1 to 4 carbon atoms are referred to as lower alkyl groups. When said lower alkyl groups lack substituents, they are referred to as lower alkyl groups. More preferably, an alkyl group is a medium size alkyl having 1 to 10 carbon atoms e.g., methyl, ethyl, propyl, 2-propyl, *n*-butyl, *iso*-butyl, *tert*-butyl, pentyl, and the like. Most preferably, it is a lower alkyl having 1 to 4 carbon atoms e.g., methyl, ethyl, propyl, 2-propyl, *n*-butyl, *iso*-butyl, or *tert*-butyl, and the like.

"Substituted alkyl" means the alkyl group as defined above is substituted with one or more, more preferably one to three, even more preferably one or two substituent(s) independently selected from the group consisting of halo, hydroxy, lower alkoxy, aryl optionally substituted with one or more groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, aryloxy optionally substituted with one or more groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, 6-member heteroaryl having from 1 to 3 nitrogen atoms in the ring, the carbons in the ring being optionally substituted with one or more groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, 5-member heteroaryl having from 1 to 3 heteroatoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur, the carbon and the nitrogen atoms in the group being optionally substituted with one or more groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, 5- or 6-member heteroalicyclic group having from 1 to 3 heteroatoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur, the carbon and nitrogen (if present) atoms in the group being optionally substituted with one or more groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, mercapto, (lower alkyl)thio, arylthio

optionally substituted with one or more groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, cyano, acyl, thioacyl, O-carbamyl, N-carbamyl, O-thiocarbamyl, N-thiocarbamyl, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, and $-NR^{18}R^{19}$,
5 wherein R^{18} and R^{19} are independently selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, trihalomethyl, (C_3-C_6) cycloalkyl, lower alkenyl, lower alkynyl and aryl optionally substituted with one or more, groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups.

Preferably, the alkyl group is substituted with one or two substituents independently
10 selected from the group consisting of hydroxy, 5- or 6-member heteroalicyclic group having from 1 to 3 heteroatoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur, the carbon and nitrogen (if present) atoms in the group being optionally substituted with one or more groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, 5-member heteroaryl having from 1 to 3
15 heteroatoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur, the carbon and the nitrogen atoms in the group being optionally substituted with one or more groups, preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, 6-member heteroaryl having from 1 to 3 nitrogen atoms in the ring, the carbons in the ring being optionally substituted with one or more groups,
20 preferably one, two or three groups which are independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, or $-NR^{18}R^{19}$, wherein R^{18} and R^{19} are independently selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl. Even more preferably the alkyl group is substituted with one or two substituents which are independently of each other hydroxy, dimethylamino, ethylamino, diethylamino, dipropylamino, pyrrolidino, piperidino,
25 morpholino, piperazino, 4-lower alkylpiperazino, phenyl, imidazolyl, pyridinyl, pyridazinyl, pyrimidinyl, oxazolyl, triazinyl, and the like.

"Cycloalkyl" refers to a 3 to 8 member all-carbon monocyclic ring, an all-carbon 5-member/6-member or 6-member/6-member fused bicyclic ring or a multicyclic fused ring (a
30 "fused" ring system means that each ring in the system shares an adjacent pair of carbon atoms with each other ring in the system) group wherein one or more of the rings may contain one or more double bonds but none of the rings has a completely conjugated pi-electron system.

Examples, without limitation, of cycloalkyl groups are cyclopropane, cyclobutane, cyclopentane, cyclopentene, cyclohexane, cyclohexadiene, adamantane, cycloheptane, cycloheptatriene, and the like.

29

"Substituted cycloalkyl" means a cycloalkyl group as defined above that is substituted with one or more, more preferably one or two substituents, independently selected from the group consisting of lower alkyl, trihaloalkyl, halo, hydroxy, lower alkoxy, aryl optionally substituted with one or more, preferably one or two groups independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, aryloxy optionally substituted with one or more, preferably one or two groups independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, 6-member heteroaryl having from 1 to 3 nitrogen atoms in the ring, the carbons in the ring being optionally substituted with one or more, preferably one or two groups independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, 5-member heteroaryl having from 1 to 3 heteroatoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur, the carbon and nitrogen atoms of the group being optionally substituted with one or more, preferably one or two groups independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, 5- or 6-member heteroalicyclic group having from 1 to 3 heteroatoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur, the carbon and nitrogen (if present) atoms in the group being optionally substituted with one or more, preferably one or two groups independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, mercapto, (lower alkyl)thio, arylthio optionally substituted with one or more, preferably one or two groups independently of each other halo, hydroxy, lower alkyl or lower alkoxy groups, cyano, acyl, thioacyl, O-carbamyl, N-carbamyl, O-thiocarbamyl, N-thiocarbamyl, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, and $-NR^{18}R^{19}$ are as defined above.

"Alkenyl" refers to a lower alkyl group, as defined herein, consisting of at least two carbon atoms and at least one carbon-carbon double bond. Representative examples include, but are not limited to, ethenyl, 1-propenyl, 2-propenyl, 1-, 2-, or 3-butenyl, and the like.

"Alkynyl" refers to a lower alkyl group, as defined herein, consisting of at least two carbon atoms and at least one carbon-carbon triple bond. Representative examples include, but are not limited to, ethynyl, 1-propynyl, 2-propynyl, 1-, 2-, or 3-butynyl, and the like.

"Aryl" refers to an all-carbon monocyclic or fused-ring polycyclic (i.e., rings which share adjacent pairs of carbon atoms) groups of 1 to 12 carbon atoms having a completely conjugated pi-electron system. Examples, without limitation, of aryl groups are phenyl, naphthalenyl and anthracenyl. The aryl group may be substituted or unsubstituted. When substituted, the substituted group(s) is preferably one or more, more preferably one, two or three, even more preferably one or two, independently selected from the group consisting of lower alkyl, trihaloalkyl, halo, hydroxy, lower alkoxy, mercapto, (lower alkyl)thio, cyano, acyl, thioacyl, O-carbamyl, N-carbamyl, O-thiocarbamyl, N-thiocarbamyl, C-amido, N-amido,

nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, and $-NR^{18}R^{19}$, with R^{18} and R^{19} as defined above. Preferably, the aryl group is optionally substituted with one or two substituents independently selected from halo, lower alkyl, trihaloalkyl, hydroxy, mercapto, cyano, N-amido, mono or dialkylamino, carboxy, or N-sulfonamido.

5 "Heteroaryl" refers to a monocyclic or fused ring (i.e., rings which share an adjacent pair of atoms) group of 5 to 12 ring atoms containing one, two, or three ring heteroatoms selected from N, O, or S, the remaining ring atoms being C, and, in addition, having a completely conjugated pi-electron system. Examples, without limitation, of unsubstituted heteroaryl groups are pyrrole, furan, thiophene, imidazole, oxazole, thiazole, pyrazole,
10 pyridine, pyrimidine, quinoline, isoquinoline, purine and carbazole. The heteroaryl group may be substituted or unsubstituted. When substituted, the substituted group(s) is preferably one or more, more preferably one, two, or three, even more preferably one or two, independently selected from the group consisting of lower alkyl, trihaloalkyl, halo, hydroxy, lower alkoxy, mercapto, (lower alkyl)thio, cyano, acyl, thioacyl, O-carbamyl, N-carbamyl, O-thiocarbamyl,
15 N-thiocarbamyl, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, and $-NR^{18}R^{19}$, with R^{18} and R^{19} as defined above. Preferably, the heteroaryl group is optionally substituted with one or two substituents independently selected from halo, lower alkyl, trihaloalkyl, hydroxy, mercapto, cyano, N-amido, mono or dialkylamino, carboxy, or N-sulfonamido.

20 "Heteroalicyclic" refers to a monocyclic or fused ring group having in the ring(s) of 5 to 9 ring atoms in which one or two ring atoms are heteroatoms selected from N, O, or $S(O)_n$ (where n is an integer from 0 to 2), the remaining ring atoms being C. The rings may also have one or more double bonds. However, the rings do not have a completely conjugated pi-electron system. Examples, without limitation, of unsubstituted heteroalicyclic groups are
25 pyrrolidino, piperidino, piperazino, morpholino, thiomorpholino, homopiperazino, and the like. The heteroalicyclic ring may be substituted or unsubstituted. When substituted, the substituted group(s) is preferably one or more, more preferably one, two or three, even more preferably one or two, independently selected from the group consisting of lower alkyl, trihaloalkyl, halo, hydroxy, lower alkoxy, mercapto, (lower alkyl)thio, cyano, acyl, thioacyl, O-carbamyl, N-carbamyl, O-thiocarbamyl, N-thiocarbamyl, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, and $-NR^{18}R^{19}$, with R^{18} and R^{19} as
30 defined above. Preferably, the heteroalicyclic group is optionally substituted with one or two substituents independently selected from halo, lower alkyl, trihaloalkyl, hydroxy, mercapto, cyano, N-amido, mono or dialkylamino, carboxy, or N-sulfonamido.

23

Preferably, the heteroalicyclic group is optionally substituted with one or two substituents independently selected from halo, lower alkyl, trihaloalkyl, hydroxy, mercapto, cyano, N-amido, mono or dialkylamino, carboxy, or N-sulfonamido.

"Heterocycle" means a saturated cyclic radical of 3 to 8 ring atoms in which one or two
5 ring atoms are heteroatoms selected from N, O, or S(O)_n (where n is an integer from 0 to 2), the remaining ring atoms being C, where one or two C atoms may optionally be replaced by a carbonyl group. The heterocyclyl ring may be optionally substituted independently with one, two, or three substituents selected from optionally substituted lower alkyl (substituted with 1 or 2 substituents independently selected from carboxy or ester), haloalkyl, cyanoalkyl, halo, nitro,
10 cyano, hydroxy, alkoxy, amino, monoalkylamino, dialkylamino, aralkyl, heteroaralkyl, -COR (where R is alkyl) or -COOR where R is (hydrogen or alkyl). More specifically the term heterocyclyl includes, but is not limited to, tetrahydropyranyl, 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane, piperidino, N-methylpiperidin-3-yl, piperazino, N-methylpyrrolidin-3-yl, 3-pyrrolidino, morpholino, thiomorpholino, thiomorpholino-1-oxide, thiomorpholino-1,1-dioxide, 4-
15 ethyloxycarbonylpiperazino, 3-oxopiperazino, 2-imidazolidone, 2-pyrrolidinone, 2-oxohomopiperazino, tetrahydropyrimidin-2-one, and the derivatives thereof. Preferably, the heterocycle group is optionally substituted with one or two substituents independently selected from halo, lower alkyl, lower alkyl substituted with carboxy, ester hydroxy, mono or dialkylamino.

20 "Hydroxy" refers to an -OH group.

"Alkoxy" refers to both an -O-(alkyl) and an -O-(cycloalkyl) group. Representative examples include, but are not limited to, e.g., methoxy, ethoxy, propoxy, butoxy, cyclopropyloxy, cyclobutyloxy, cyclopentyloxy, cyclohexyloxy, and the like.

"Aryloxy" refers to both an -O-aryl and an -O-heteroaryl group, as defined herein.
25 Representative examples include, but are not limited to, phenoxy, pyridinyloxy, furanyloxy, thienyloxy, pyrimidinyloxy, pyrazinyloxy, and the like, and derivatives thereof.

"Mercapto" refers to an -SH group.

"Alkylthio" refers to both an -S-alkyl and an -S-cycloalkyl group. Representative examples include, but are not limited to, e.g., methylthio, ethylthio, propylthio, butylthio,
30 cyclopropylthio, cyclobutylthio, cyclopentylthio, cyclohexylthio, and the like.

"Arylthio" refers to both an -S-aryl and an -S-heteroaryl group, as defined herein. Representative examples include, but are not limited to, phenylthio, pyridinylthio, furanylthio, thientylthio, pyrimidinylthio, and the like and derivatives thereof.

"Acyl" refers to a -C(O)-R" group, where R" is selected from the group consisting of

hydrogen, lower alkyl, trihalomethyl, cycloalkyl, aryl optionally substituted with one or more, preferably one, two, or three substituents selected from the group consisting of lower alkyl, trihalomethyl, lower alkoxy, halo and $-NR^{18}R^{19}$ groups, heteroaryl (bonded through a ring carbon) optionally substituted with one or more, preferably one, two, or three substituents
 5 selected from the group consisting of lower alkyl, trihaloalkyl, lower alkoxy, halo and $-NR^{18}R^{19}$ groups and heteroalicyclic (bonded through a ring carbon) optionally substituted with one or more, preferably one, two, or three substituents selected from the group consisting of lower alkyl, trihaloalkyl, lower alkoxy, halo and $-NR^{18}R^{19}$ groups. Representative acyl groups include, but are not limited to, acetyl, trifluoroacetyl, benzoyl, and the like

10 "Aldehyde" refers to an acyl group in which R" is hydrogen.

"Thioacyl" refers to a $-C(S)-R$ " group, with R" as defined herein.

"Ester" refers to a $-C(O)O-R$ " group with R" as defined herein except that R" cannot be hydrogen.

"Acetyl" group refers to a $-C(O)CH_3$ group.

15 "Halo" group refers to fluorine, chlorine, bromine or iodine, preferably fluorine or chlorine.

"Trihalomethyl" group refers to a $-CX_3$ group wherein X is a halo group as defined herein.

20 "Trihalomethanesulfonyl" group refers to a $X_3CS(=O)_2-$ groups with X as defined above.

"Cyano" refers to a $-C\equiv N$ group.

"Methylenedioxy" refers to a $-OCH_2O-$ group where the two oxygen atoms are bonded to adjacent carbon atoms.

25 "Ethylenedioxy" group refers to a $-OCH_2CH_2O-$ where the two oxygen atoms are bonded to adjacent carbon atoms.

"S-sulfonamido" refers to a $-S(O)_2NR^{18}R^{19}$ group, with R^{18} and R^{19} as defined herein.

"N-sulfonamido" refers to a $-NR^{18}S(O)_2R^{19}$ group, with R^{18} and R^{19} as defined herein.

"O-carbamyl" group refers to a $-OC(O)NR^{18}R^{19}$ group with R^{18} and R^{19} as defined herein.

30 "N-carbamyl" refers to an $R^{18}OC(O)NR^{19}-$ group, with R^{18} and R^{19} as defined herein.

"O-thiocarbamyl" refers to a $-OC(S)NR^{18}R^{19}$ group with R^{18} and R^{19} as defined herein.

"N-thiocarbamyl" refers to a $R^{18}OC(S)NR^{19}-$ group, with R^{18} and R^{19} as defined herein.

"Amino" refers to an $-NR^{18}R^{19}$ group, wherein R^{18} and R^{19} are both hydrogen.

"C-amido" refers to a $-C(O)NR^{18}R^{19}$ group with R^{18} and R^{19} as defined herein.

35 "N-amido" refers to a $R^{18}C(O)NR^{19}-$ group, with R^{18} and R^{19} as defined herein.

24

"Nitro" refers to a $-\text{NO}_2$ group.

"Haloalkyl" means an alkyl, preferably lower alkyl as defined above that is substituted with one or more same or different halo atoms, e.g., $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$, and the like.

5 "Aryl" means alkyl, preferably lower alkyl as defined above which is substituted with an aryl group as defined above, e.g., $-\text{CH}_2\text{phenyl}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{phenyl}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{phenyl}$, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{phenyl}$, and the like and derivatives thereof.

"Heteroaralkyl" group means alkyl, preferably lower alkyl as defined above which is substituted with a heteroaryl group, e.g., $-\text{CH}_2\text{pyridinyl}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{pyrimidinyl}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{imidazolyl}$, and the like, and derivatives thereof.

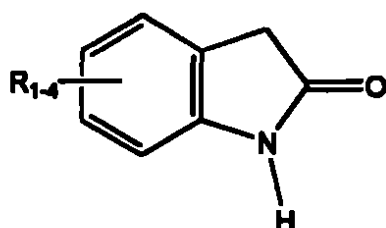
10 "Monoalkylamino" means a radical $-\text{NHR}$ where R is an unsubstituted alkyl or cycloalkyl group as defined above, e.g., methylamino, (1-methylethyl)amino, cyclohexylamino, and the like.

"Dialkylamino" means a radical $-\text{NRR}$ where each R is independently an unsubstituted alkyl or cycloalkyl group as defined above, e.g., dimethylamino, diethylamino, (1-methylethyl)-ethylamino, cyclohexylmethylamino, cyclopentylmethylamino, and the like.

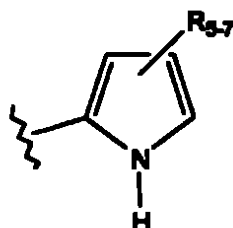
"Cyanoalkyl" means alkyl, preferably lower alkyl as defined above, which is substituted with 1 or 2 cyano groups.

"Optional" or "optionally" means that the subsequently described event or circumstance may but need not occur, and that the description includes instances where the event or circumstance occurs and instances in which it does not. For example, "heterocycle group optionally substituted with an alkyl group" means that the alkyl may but need not be present, and the description includes situations where the heterocycle group is substituted with an alkyl group and situations where the heterocycle group is not substituted with the alkyl group.

The terms "2-indolinone", "indolin-2-one" and "2-oxindole" are used interchangeably herein to refer to a molecule having the chemical structure:



The term "pyrrole" refers to a molecule having the chemical structure:



5 The term "pyrrole substituted 2-indolinone" and "3-pyrrolidenyl-2-indolinone" are used interchangeably herein to refer to a chemical compound having the general structure shown in Formula (I).

Compounds that have the same molecular formula but differ in the nature or sequence of bonding of their atoms or the arrangement of their atoms in space are termed "isomers". Isomers that differ in the arrangement of their atoms in space are termed "stereoisomers".

10 Stereoisomers that are not mirror images of one another are termed "diastereomers" and those that are non-superimposable mirror images of each other are termed "enantiomers". When a compound has an asymmetric center, for example, it is bonded to four different groups, a pair of enantiomers is possible. An enantiomer can be characterized by the absolute configuration of its asymmetric center and is described by the R- and S-sequencing rules of Cahn and Prelog, or by the manner in which the molecule rotates the plane of polarized light and designated as dextrorotatory or levorotatory (i.e., as (+) or (-)-isomers respectively). A chiral compound can exist as either individual enantiomer or as a mixture thereof. A mixture containing equal proportions of the enantiomers is called a "racemic mixture".

20 The compounds of this invention may possess one or more asymmetric centers; such compounds can therefore be produced as individual (R)- or (S)- stereoisomers or as mixtures thereof. For example, if the R⁶ substituent in a compound of formula (I) is 2-hydroxyethyl, then the carbon to which the hydroxy group is attached is an asymmetric center and therefore the compound of Formula (I) can exist as an (R)- or (S)-stereoisomer. Unless indicated otherwise, the description or naming of a particular compound in the specification and claims is intended to include both individual enantiomers and mixtures, racemic or otherwise, thereof. 25 The methods for the determination of stereochemistry and the separation of stereoisomers are well-known in the art (see discussion in Chapter 4 of "Advanced Organic Chemistry", 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992).

30 The compounds of the present invention may exhibit the phenomena of tautomerism and structural isomerism. For example, the compounds of Formula (I) described herein may

25

adopt an E or a Z configuration about the double bond connecting the 2-indolinone moiety to the pyrrole moiety or they may be a mixture of E and Z. This invention encompasses any tautomeric or structural isomeric form and mixtures thereof which possess the ability to modulate RTK, CTK and/or STK activity and is not limited to any one tautomeric or structural isomeric form.

A "pharmaceutical composition" refers to a mixture of one or more of the compounds described herein, or physiologically/pharmaceutically acceptable salts or prodrugs thereof, with other chemical components, such as physiologically/pharmaceutically acceptable carriers and excipients. The purpose of a pharmaceutical composition is to facilitate administration of a compound to an organism.

The compounds of the present invention may also act as a prodrug. A "prodrug" refers to an agent which is converted into the parent drug *in vivo*. Prodrugs are often useful because, in some situations, they may be easier to administer than the parent drug. They may, for instance, be bioavailable by oral administration whereas the parent drug is not. The prodrug may also have improved solubility in pharmaceutical compositions over the parent drug. An example, without limitation, of a prodrug would be a compound of the present invention which is administered as an ester (the "prodrug") to facilitate transmittal across a cell membrane where water solubility is detrimental to mobility but then is metabolically hydrolyzed to the carboxylic acid, the active entity, once inside the cell where water solubility is beneficial.

A further example of a prodrug might be a short polypeptide, for example, without limitation, a 2 - 10 amino acid polypeptide, bonded through a terminal amino group to a carboxy group of a compound of this invention wherein the polypeptide is hydrolyzed or metabolized *in vivo* to release the active molecule. The prodrugs of a compound of Formula (I) are within the scope of this invention.

Additionally, it is contemplated that a compound of Formula (I) would be metabolized by enzymes in the body of the organism such as human being to generate a metabolite that can modulate the activity of the protein kinases. Such metabolites are within the scope of the present invention.

As used herein, a "physiologically/pharmaceutically acceptable carrier" refers to a carrier or diluent that does not cause significant irritation to an organism and does not abrogate the biological activity and properties of the administered compound.

An "pharmaceutically acceptable excipient" refers to an inert substance added to a pharmaceutical composition to further facilitate administration of a compound. Examples, without limitation, of excipients include calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars and types of starch, cellulose derivatives, gelatin, vegetable oils and polyethylene glycols.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable salt" refers to those salts which retain the biological effectiveness and properties of the parent compound. Such salts include:

(i) acid addition salt which is obtained by reaction of the free base of the parent compound with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, nitric acid, phosphoric acid, sulfuric acid, and perchloric acid and the like, or with organic acids such as acetic acid, oxalic acid, (D) or (L) malic acid, maleic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, *p*-toluenesulfonic acid, salicylic acid, tartaric acid, citric acid, succinic acid or malonic acid and the like, preferably hydrochloric acid or (L)-malic acid such as the L-malate salt of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid(2-diethylaminoethyl)amide; or

(2) salts formed when an acidic proton present in the parent compound either is replaced by a metal ion, e.g., an alkali metal ion, an alkaline earth ion; or coordinates with an organic base. Exemplary ions include aluminum, calcium, lithium, magnesium, potassium, sodium and zinc in their usual valences. Preferred organic base include protonated tertiary amines and quaternary ammonium cations, including in part, trimethylamine, diethylamine, N,N'-dibenzylethylenediamine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, meglumine (N-methylglucamine) and procaine.

"Method" refers to manners, means, techniques and procedures for accomplishing a given task including, but not limited to, those manners, means, techniques and procedures either known to, or readily developed from known manners, means, techniques and procedures by, practitioners of the chemical, pharmaceutical, biological, biochemical and medical arts.

"Treat", "treating" and "treatment" refers to any process, action, application, therapy, or the like, wherein a mammal, including a human being, is subject to medical aid with the object of improving the mammal's condition, directly or indirectly. With regard particularly to cancer, these terms simply mean that the life expectancy of an individual affected with a cancer will be increased or that one or more of the symptoms of the disease. This can be monitored by delayed appearance of primary or secondary tumors, slowed development of primary or secondary tumors, decreased occurrence of primary or secondary tumors, slowed or decreased severity of secondary effects of disease, arrested tumor growth and regression of tumors, among others.

The term "prevention" includes either preventing the onset of clinically evident neoplasia altogether or preventing the onset of a preclinically evident stage of neoplasia in individuals at risk. Also intended to be encompassed by this definition is the prevention of initiation for malignant cells or to arrest or reverse the progression of premalignant cells to malignant cells. This includes prophylactic treatment of those at risk of developing the

neoplasia.

The phrase "therapeutically-effective" is intended to qualify the amount of each agent that will achieve the goal of improvement in neoplastic disease severity and the frequency of neoplastic disease over treatment of each agent by itself, while avoiding adverse side effects typically associated with alternative therapies.

A "therapeutic effect" or "therapeutic effective amount" is intended to qualify the amount of an anticancer agent required to relieve to some extent one or more of the symptoms of a neoplasia disorder, including, but is not limited to: 1) reduction in the number of cancer cells; 2) reduction in tumor size; 3) inhibition (i.e., slowing to some extent, preferably stopping) of cancer cell infiltration into peripheral organs; 3) inhibition (i.e., slowing to some extent, preferably stopping) of tumor metastasis; 4) inhibition, to some extent, of tumor growth; 5) relieving or reducing to some extent one or more of the symptoms associated with the disorder; and/or 6) relieving or reducing the side effects associated with the administration of anticancer agents.

The phrase "combination therapy" (or "co-therapy") embraces the administration of a protein kinase inhibitor and a cyclooxygenase-2 inhibitor as part of a specific treatment regimen intended to provide a beneficial effect from the co-action of these therapeutic agents. The beneficial effect of the combination includes, but is not limited to, pharmacokinetic or pharmacodynamic co-action resulting from the combination of therapeutic agents.

Administration of these therapeutic agents in combination typically is carried out over a defined time period (usually minutes, hours, days or weeks depending upon the combination selected). "Combination therapy" generally is not intended to encompass the administration of two or more of these therapeutic agents as part of separate monotherapy regimens that incidentally and arbitrarily result in the combinations of the present invention. "Combination therapy" is intended to embrace administration of these therapeutic agents in a sequential manner, that is, wherein each therapeutic agent is administered at a different time, as well as administration of these therapeutic agents, or at least two of the therapeutic agents, in a substantially simultaneous manner. Substantially simultaneous administration can be accomplished, for example, by administering to the subject a single capsule having a fixed ratio of each therapeutic agent or in multiple, single capsules for each of the therapeutic agents. Sequential or substantially simultaneous administration of each therapeutic agent can be effected by any appropriate route including, but not limited to, oral routes, intravenous routes, intramuscular routes, and direct absorption through mucous membrane tissues. The therapeutic agents can be administered by the same route or by different routes. For example, a first therapeutic agent of the combination selected may be administered by intravenous

injection while the other therapeutic agents of the combination may be administered orally. Alternatively, for example, both the therapeutic agents may be administered orally or both therapeutic agents may be administered by intravenous injection. The sequence in which the therapeutic agents are administered is not narrowly critical. "Combination therapy" also can

5 embrace the administration of the therapeutic agents as described above in further combination with other biologically active ingredients (such as, but not limited to, a second and different antineoplastic agent) and non-drug therapies (such as, but not limited to, surgery or radiation treatment). Where the combination therapy further comprises radiation treatment, the radiation treatment may be conducted at any suitable time so long as a beneficial effect from the co-
10 action of the combination of the therapeutic agents and radiation treatment is achieved. For example, in appropriate cases, the beneficial effect is still achieved when the radiation treatment is temporally removed from the administration of the therapeutic agents, perhaps by days or even weeks.

"Adjunctive therapy" encompasses treatment of a subject with agents that reduce or
15 avoid side effects associated with the combination therapy of the present invention, including, but not limited to, those agents, for example, that reduce the toxic effect of anticancer drugs, e.g., bone resorption inhibitors, cardioprotective agents; prevent or reduce the incidence of nausea and vomiting associated with chemotherapy, radiotherapy or operation; or reduce the incidence of infection associated with the administration of myelosuppressive anticancer drugs.

20

PREFERRED EMBODIMENTS

While the broadest definition is set forth in the Summary of the Invention, certain compounds of Formula (I), (II) and (III) set forth below are preferred for carrying out the present invention.

25 A. Protein tyrosine kinase inhibitor-Compounds of Formula (I):

(1) A preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^1 , R^3 , and R^4 are hydrogen.

(2) Another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^1 , R^2 , and R^4 are hydrogen.

30 (3) Another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^1 , R^2 , and R^3 are hydrogen.

(4) Another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^2 , R^3 , and R^4 are hydrogen.

(5) Another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^1 , R^2 , R^3 and R^4 are
35 hydrogen.

22

- (6) Yet another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^5 , R^6 or R^7 , preferably R^5 or R^6 , more preferably R^6 is $-\text{COR}^{10}$ wherein R^{10} is $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ wherein:

R^{11} is hydrogen or lower alkyl, preferably hydrogen or methyl;

5 n is 2, 3 or 4, preferably 2 or 3; and

R^{12} is $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ wherein R^{13} and R^{14} are independently alkyl, more preferably lower lower alkyl or R^{13} and R^{14} combine to form a group selected from $-(\text{CH}_2)_4-$, $-(\text{CH}_2)_5-$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ or $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2-$, preferably R^{13} and R^{14} are independently hydrogen, methyl, ethyl, or combine to form morpholin-4-yl, pyrrolidin-1-yl, piperazin-1-yl, or 4-methylpiperazin-1-yl.

10 More preferably, R^5 or R^6 in (6) above is N-(2-dimethylaminoethyl)-aminocarbonyl, N-(2-ethylaminoethyl)-N-methylaminocarbonyl, N-(3-dimethylaminopropyl)-aminocarbonyl, N-(2-diethylaminoethyl)aminocarbonyl, N-(3-ethylaminopropyl)aminocarbonyl, N-(3-diethylaminopropyl)aminocarbonyl, 3-pyrrolidin-1-yl-propylaminocarbonyl, 3-morpholin-4-ylpropyl-aminocarbonyl, 2-pyrrolidin-1-ylethylaminocarbonyl, 2-morpholin-4-ylethylaminocarbonyl, 2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethylaminocarbonyl, 2-(4-methylpiperazin-1-yl)propylaminocarbonyl, 2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethylaminocarbonyl or 2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)propylaminocarbonyl, even more preferably N-(2-diethyl-aminocarbonyl)aminocarbonyl or N-(2-ethylaminoethyl)amino-carbonyl.

20 (7) Yet another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^5 , R^6 or R^7 , preferably R^5 or R^6 , more preferably R^6 is $-\text{COR}^{10}$ wherein R^{10} is $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is alkyl, preferably lower alkyl substituted with hydroxy, aryl, heteroaryl, heteroalicyclic, or carboxy, more preferably methyl, ethyl, propyl or butyl substituted with hydroxy, aryl, heteroalicyclic such as piperidine, piperazine, morpholine and the like, heteroaryl, or carboxy. Even more preferably within this group (7), R^5 or R^6 is 2-ethoxycarbonylmethyl-aminocarbonyl, carboxymethylamino-carbonyl, 3-hydroxypropyl-aminocarbonyl, 2-hydroxyethylaminocarbonyl, 3-triazin-1-ylpropylamino-carbonyl, triazin-1-ylethylaminocarbonyl, 4-hydroxy-phenylethylaminocarbonyl, 3-imidazol-1-ylpropyl-aminocarbonyl, pyridin-4-ylmethylaminocarbonyl, 2-pyridin-2-ylethylaminocarbonyl or 2-imidazol-1-ylethylaminocarbonyl.

30 (8) Yet another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^5 , R^6 or R^7 , preferably R^5 or R^6 , more preferably R^6 is $-\text{COR}^{10}$ wherein R^{10} is $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ wherein:

R^{11} is hydrogen or alkyl, preferably hydrogen or methyl;

n is 2, 3 or 4, preferably 2 or 3; and

R^{12} is $-NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} and R^{14} together combine to form a heterocycle, preferably a 5, 6 or 7 membered heterocycle containing a carbonyl group and 1 or 2 nitrogen atoms. Preferably, R^5 or R^6 is 2-(3-ethoxycarbonylmethylpiperazin-1-yl)ethylaminocarbonyl, 2-(3-oxopiperazin-1-yl)ethylaminocarbonyl, 2-(imidazolidin-1-yl-2-one)ethylaminocarbonyl, 2-(tetrahydropyrimidin-1-yl-2-one)ethylaminocarbonyl, 2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-ethylaminocarbonyl, 3-(4-methylpiperazin-1-yl)-propylaminocarbonyl, 3-(3-ethoxycarbonylmethylpiperazin-1-yl)-propylaminocarbonyl, 3-(3-oxopiperazin-1-yl)propyl-aminocarbonyl, 3-(imidazolidin-1-yl-2-one)propyl-aminocarbonyl, 3-(tetrahydropyrimidin-1-yl-2-one)-propylaminocarbonyl, 3-(2-oxopyrrolidin-1-yl)propyl-aminocarbonyl, 2-(2-oxohomopiperidin-1-yl)ethylamino-carbonyl or 3-(2-oxohomopiperidin-1-yl)propylaminocarbonyl.

- (9) Yet another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^5 , R^6 or R^7 , preferably R^5 or R^6 , more preferably R^6 is $-COR^{10}$ wherein:

(a) R^{10} is $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ wherein:

R^{11} is hydrogen or alkyl, preferably hydrogen or methyl;

n is 2, 3 or 4, preferably 2 or 3; and

- R^{12} is $-NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is cyanoalkyl or $-NHCOR^a$ where R^a is alkyl; or

(b) R^{10} is $-NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} and R^{14} together combine to form a heterocycle not containing a carbonyl group within the ring. Preferably, R^5 or R^6 is 2-(2-cyanoethylamino)ethylaminocarbonyl, 2-(acetylamino)-ethylaminocarbonyl, morpholinocarbonyl, piperidin-1-yl-carbonyl, 2-cyanomethylaminoethylaminocarbonyl or piperidin-1-ylcarbonyl.

- (10) Another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^5 is $-COR^{10}$ wherein R^{10} is $-NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is lower alkyl substituted with hydroxy, lower alkyl substituted with hydroxyalkylamino, carboxy, or $-NR^{18}R^{19}$ wherein R^{18} and R^{19} are independently hydrogen or lower alkyl, more preferably R^5 is 2-[(diethylamino)-2-hydroxyethyl]aminocarbonyl, 2-(N-ethyl-N-2-hydroxyethylamino)ethylaminocarbonyl, carboxymethylamino-carbonyl, or 2-(2-hydroxyethylamino)ethylamino-carbonyl.

- (11) Yet another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R^6 is $-COR^{10}$ wherein R^{10} is $-NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is lower alkyl substituted

28

with hydroxy, lower alkyl substituted with hydroxyalkylamino, carboxy, or -NR¹⁸R¹⁹ wherein R¹⁸ and R¹⁹ are independently hydrogen or lower alkyl; more preferably R⁶ is [2-(diethylamino)-2-hydroxy]ethylaminocarbonyl, 2-(N-ethyl-N-2-hydroxyethylamino)ethylaminocarbonyl, carboxymethylaminocarbonyl, or 2-(2-hydroxyethylamino)ethylamino-carbonyl.

(12) Yet another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R⁵ is -COR¹⁰ wherein R¹⁰ is -NR¹¹(CH₂)_nR¹² wherein R¹² is -N⁺(O⁻)NR¹³R¹⁴ or -N(OH)R¹³ wherein R¹³ and R¹⁴ are independently selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl, preferably R⁵ is 2-(N-hydroxy-N-ethylamino)-ethylaminocarbonyl or 2-[N⁺(O⁻)(C₂H₅)₂]ethyl-aminocarbonyl

(13) Yet another preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein R⁶ is -COR¹⁰ wherein R¹⁰ is -NR¹¹(CH₂)_nR¹² wherein R¹² is -N⁺(O⁻)NR¹³R¹⁴ or -N(OH)R¹³ wherein R¹³ and R¹⁴ are independently selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl, preferably R⁶ is 2-(N-hydroxy-N-ethylamino)ethylaminocarbonyl or 2-[N⁺(O⁻)(C₂H₅)₂]ethyl-aminocarbonyl.

(14) In the above preferred groups (6)-(13) when R⁵ is -COR¹⁰, then a more preferred group of compounds is that wherein:

R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl, preferably hydrogen, methyl, ethyl, isopropyl, tert-butyl, isobutyl, or n-butyl, more preferably hydrogen or methyl; and

R⁷ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, aryl, heteroaryl, and -C(O)R¹⁷ wherein R¹⁷ is hydroxy, alkyl or aryl, more preferably hydrogen, methyl, ethyl, isopropyl, n-, iso or tert-butyl, phenyl, benzoyl, acetyl or carboxy, even more preferably methyl, hydrogen or phenyl.

(15) In the above preferred groups (6)-(13) when R⁵ is -COR¹⁰, then another more preferred group of compounds is that wherein R⁶ and R⁷ combine to form -(CH₂)₄.

(16) In the above preferred groups (6)-(13) when R⁶ is -COR¹⁰, then a more preferred group of compounds is that wherein:

R⁵ is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl, preferably hydrogen, methyl, ethyl, isopropyl, tert-butyl, isobutyl, or n-butyl, more preferably hydrogen or methyl; and

R⁷ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, aryl, heteroaryl, and -C(O)R¹⁷, wherein R¹⁷ is hydroxy, alkyl or aryl, more preferably hydrogen, methyl, ethyl, isopropyl, n-, iso or tert-butyl, phenyl, benzoyl, acetyl or carboxy, even more preferably methyl, hydrogen or phenyl.

- (17) Within the above preferred and more preferred groups (6)-(16), an even more preferred group of compounds is that wherein:

R^1 is hydrogen, alkyl, $-C(O)NR^8R^9$, cycloalkyl or aryl, preferably hydrogen, phenyl, 3,4-dimethoxyphenylaminocarbonyl, 4-methoxy-3-chlorophenylaminocarbonyl, even more preferably hydrogen or methyl, most preferably hydrogen;

R^2 is cyano, hydrogen, halo, lower alkoxy, aryl or $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is hydrogen, aryl or alkyl, preferably R^2 is hydrogen, chloro, bromo, fluoro, methoxy, ethoxy, phenyl, dimethylaminosulfonyl, 3-chlorophenylaminosulfonyl, carboxy, methoxy, aminosulfonyl, methylaminosulfonyl, phenylaminosulfonyl, pyridin-3-yl-aminosulfonyl, dimethylaminosulfonyl, isopropylamino-sulfonyl, more preferably hydrogen, fluoro, or bromo;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkoxy, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, aryl preferably aryl optionally substituted with one or two substituents selected from the group consisting of lower alkyl, halo, or lower alkoxy, and heteroaryl, preferably heteroaryl optionally substituted with one or two substituents selected from the group consisting of lower alkyl, halo, or lower alkoxy,; preferably hydrogen, methoxy, carboxy, phenyl, pyridin-3-yl, 3,4-dichlorophenyl, 2-methoxy-5-isopropylphenyl, 4-n-butylphenyl, 3-isopropylphenyl, more preferably hydrogen or phenyl; and

R^4 is hydrogen.

- (18) Another more preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein:

R^1 is hydrogen, alkyl, $-C(O)NR^8R^9$, cycloalkyl or aryl, preferably hydrogen, 3,4-dimethoxy-phenyl-aminocarbonyl, 4-methoxy-3-chlorophenylaminocarbonyl, even more preferably hydrogen or methyl, particularly hydrogen;

R^2 is cyano, hydrogen, halo, lower alkoxy, aryl or $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is hydrogen, aryl or alkyl, preferably R^2 is hydrogen, chloro, bromo, fluoro, methoxy, ethoxy, phenyl, dimethylaminosulfonyl, 3-chlorophenylaminosulfonyl, carboxy, methoxy, aminosulfonyl, methylaminosulfonyl, phenylaminosulfonyl, pyridin-3-yl-aminosulfonyl, dimethylaminosulfonyl, isopropylamino-sulfonyl, more preferably hydrogen, fluoro, or bromo;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkoxy, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, aryl preferably aryl optionally substituted with one or two substituents selected from the group consisting of lower alkyl, halo, or lower alkoxy, and heteroaryl, preferably heteroaryl optionally substituted with one or two substituents selected from the group consisting of lower alkyl, halo, or lower alkoxy,; preferably hydrogen,

methoxy, carboxy, phenyl, pyridin-3-yl, 3,4-dichlorophenyl, 2-methoxy-5-isopropylphenyl, 4-n-butylphenyl, 3-isopropylphenyl, more preferably hydrogen or phenyl; and

R^4 is hydrogen.

5 Within the above preferred group (18) a more preferred group of compounds is wherein:

R^5 is $-\text{COR}^{10}$ where R^{10} is as defined in the Summary of the Invention, preferably $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ or $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ as defined in the Summary of the Invention.

10 R^6 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl, preferably hydrogen, methyl, ethyl, isopropyl, tert-butyl, isobutyl, or n-butyl, more preferably hydrogen or methyl; and

15 R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, aryl, heteroaryl, and $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ wherein R^{17} is hydroxy, alkyl or aryl, more preferably hydrogen, methyl, ethyl, isopropyl, n-, iso or tert-butyl, phenyl, benzoyl, acetyl or carboxy, even more preferably methyl, hydrogen or phenyl.

In the above preferred group (18) another more preferred group of compounds is that wherein:

R^6 is $-\text{COR}^{10}$ where R^{10} is as defined in the Summary of the Invention, preferably $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ or $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ as defined in the Summary of the Invention.

20 R^5 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl, preferably hydrogen, methyl, ethyl, isopropyl, tert-butyl, isobutyl, or n-butyl, more preferably hydrogen or methyl; and

25 R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, aryl, heteroaryl, and $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ wherein R^{17} is hydroxy, alkyl or aryl, more preferably hydrogen, methyl, ethyl, isopropyl, n-, iso or tert-butyl, phenyl, benzoyl, acetyl or carboxy, even more preferably methyl, hydrogen or phenyl.

(19) Another more preferred group of compounds of Formula (I) is that wherein:

R^1 and R^4 are hydrogen;

30 R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, halo, lower alkoxy, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$ and $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkoxy, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, aryl and heteroaryl;

R^5 is $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$;

R^6 is selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl; and

35 R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl and $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$.

It is another presently preferred embodiment of this invention that, in a compound having a structure as described in (15):

R^{10} is selected from the group consisting of hydroxy, lower alkoxy and $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, wherein

5 n is 2 or 3;

R^{11} is selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl; and,

R^{12} is selected from the group consisting of aryl and $-NR^{13}R^{14}$.

It is a further presently preferred embodiment of this invention that, in a compound having a structure as described in the previous two paragraphs, R^{13} and R^{14} are independently selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, and, combined, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ or $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

10 (20) Another presently preferred embodiment of this invention is a compound in which:

R^1 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, $-(CH_2)_rR^{16}$ and $-C(O)NR^8R^9$;

15 R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, aryl and $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, lower alkoxy, aryl, heteroaryl and $-C(O)R^{15}$;

R^4 is hydrogen;

20 R^5 is selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl;

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

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl and aryl;

R^{16} is selected from the group consisting of hydroxy and $-C(O)R^{15}$; and,

r is 2 or 3.

25 A presently preferred embodiment of this invention is a compound having as structure described in the paragraph just above in which R^3 is aryl optionally substituted with one or more groups selected from the group consisting of lower alkyl, lower alkoxy and halo.

30 (21) Likewise, it is a presently preferred embodiment of this invention that, in a compound in which:

R^1 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, $-(CH_2)_rR^{16}$ and $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, aryl and $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

20

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, lower alkoxy, aryl, heteroaryl and $-C(O)R^{15}$;

R^4 is hydrogen;

R^5 is selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl;

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

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl and aryl;

R^{16} is selected from the group consisting of hydroxy and $-C(O)R^{15}$; and,

r is 2 or 3,

10 R^{10} is selected from the group consisting of hydroxy, lower alkoxy, $-NR^{13}R^{14}$ and $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, wherein n is 1, 2 or 3, R^{11} is hydrogen and R^{12} is selected from the group consisting of hydroxy, lower alkoxy, $-C(O)R^{15}$, heteroaryl and $-NR^{13}R^{14}$.

(22) A further presently preferred embodiment of this invention is a compound having a structure as described in the paragraph immediately above in which R^{13} and R^{14} are independently selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, heteroaryl and, combined, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$, or $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(23) Another presently preferred embodiment of this invention is a compound in which:

R^1 is $-C(O)NR^8R^9$, wherein R^8 is hydrogen and R^9 is aryl optionally substituted with one or more groups selected from the group consisting of halo, hydroxy and lower alkoxy;

20 R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, aryl and $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, lower alkoxy, aryl, heteroaryl and $-C(O)R^{15}$;

R^4 is hydrogen;

25 R^5 is selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl;

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

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl and aryl;

R^{16} is selected from the group consisting of hydroxy and $-C(O)R^{15}$; and,

r is 2 or 3,

30 (24) A still further presently preferred embodiment of this invention is a compound in which:

R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl;

R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, halo, lower alkoxy, aryl, $-C(O)R^{15}$ and $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, halo, aryl, heteroaryl and $-C(O)R^{15}$;

R^4 is hydrogen;

R^5 is $-C(O)R^{10}$; and,

5 R^6 and R^7 combine to form a $-(CH_2)_4-$ group.

In a compound having a structure as described in the paragraph immediately above, it is a presently preferred embodiment that R^{10} is selected from the group consisting of hydroxy, alkoxy, $-NR^{13}R^{14}$ and $-NH(CH_2)_nNR^{13}R^{14}$ wherein n is 2 or 3.

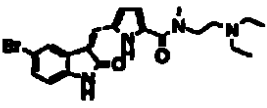
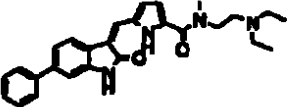
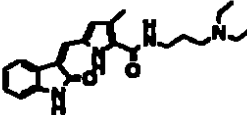
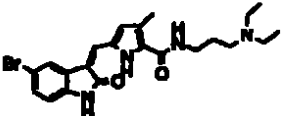
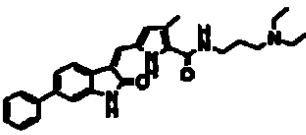
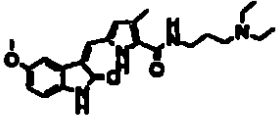
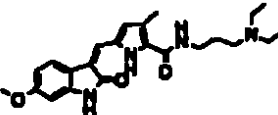
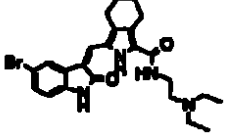
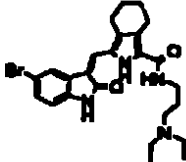
10 It is a presently preferred embodiment of this invention that, in a compound having a structure as described in the two paragraphs immediately above, R^{13} and R^{14} are independently selected from the group consisting of hydrogen, lower alkyl, and, combined, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ or $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

Representative compounds of Formula (I) are shown in Table I below.

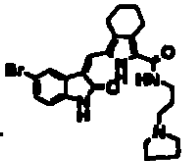
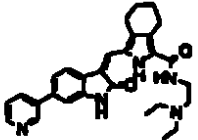
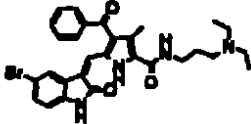
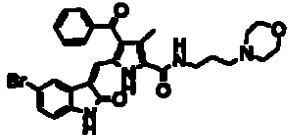
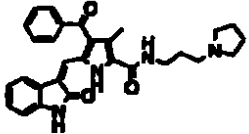
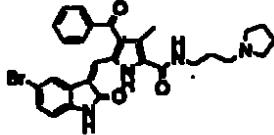
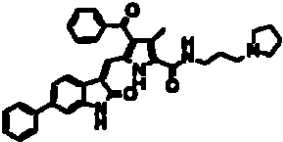
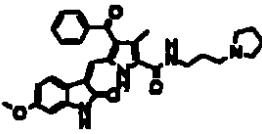
31

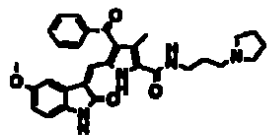
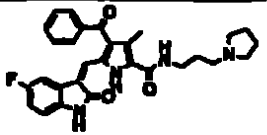
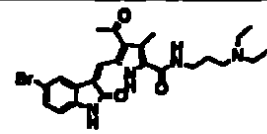
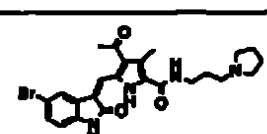
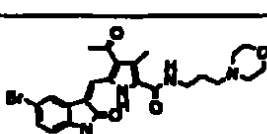
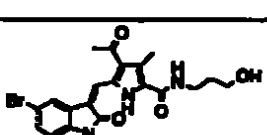
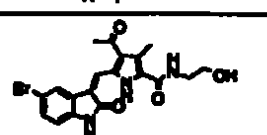
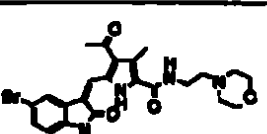
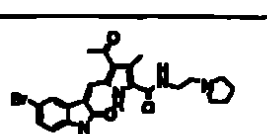
TABLE I

Example	Structure	Name
1		4-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid
2		4-Methyl-5-(1-methyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid
3		4-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid methyl ester
4		5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester
5		5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid
6		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
7		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
8		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
9		5-(2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

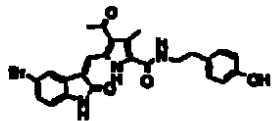
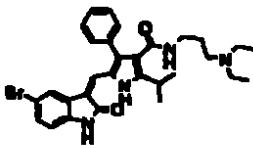
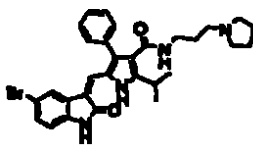
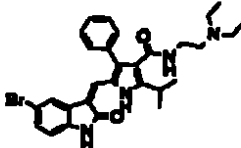
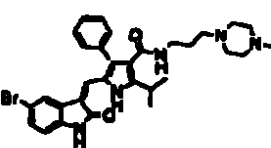
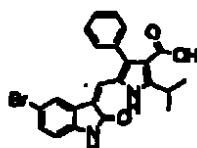
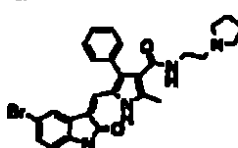
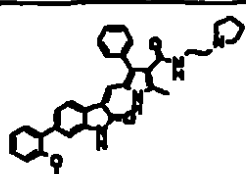
10		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)methylamide
11		5-(2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)methylamide
12		3-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
13		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
14		3-Methyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
15		5-(5-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
16		5-(6-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
17		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
18		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide

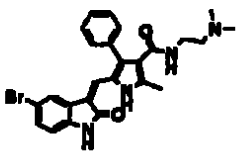
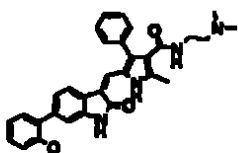
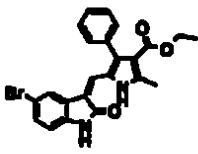
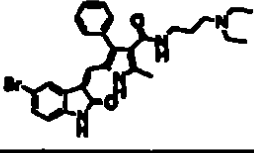
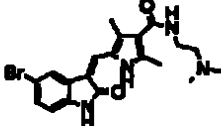
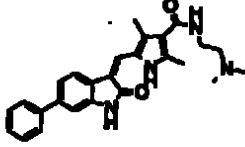
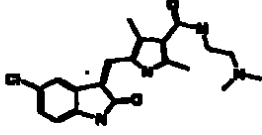
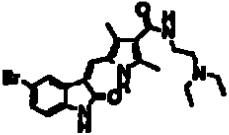
32

19		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
20		3-(2-Oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
21		4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
22		4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-morpholin-4-ylpropyl)amide
23		4-Benzoyl-3-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
24		4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
25		4-Benzoyl-3-methyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
26		4-Benzoyl-5-(6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide

27		4-Benzoyl-5-(5-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
28		4-Benzoyl-5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
29		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
30		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
31		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-morpholin-4-ylpropyl)amide
32		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-hydroxy-propyl)amide
33		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-hydroxy-ethyl)amide
34		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-morpholin-4-yl-ethyl)amide
35		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

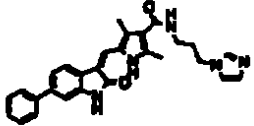
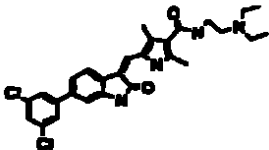
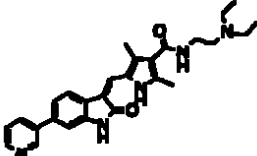
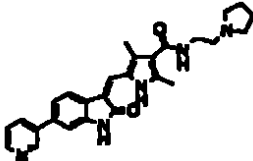
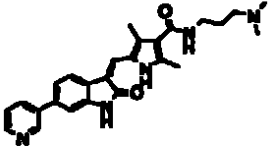
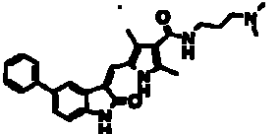
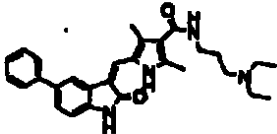
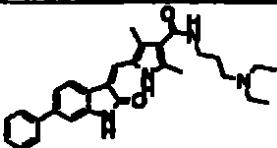
33

36		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-(4-hydroxy-phenyl)-ethyl)amide
37		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
38		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
39		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
40		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-(4-methyl-piperazin-1-yl)-propyl)amide
41		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid
42		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
43		5-(6-(2-Methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

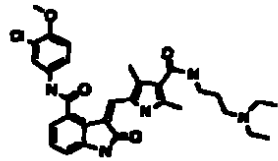
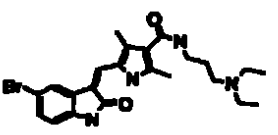
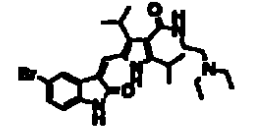
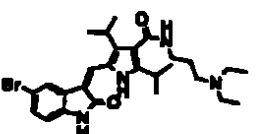
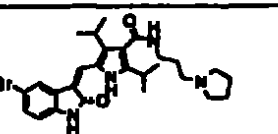
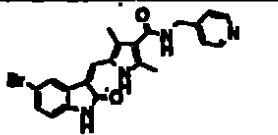
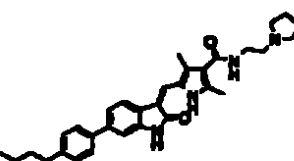
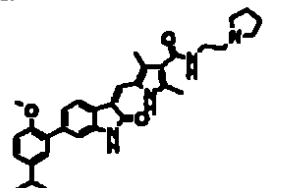
44		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
45		5-(5-(2-Methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
46		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester
47		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
48		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
49		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
50		5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide
51		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

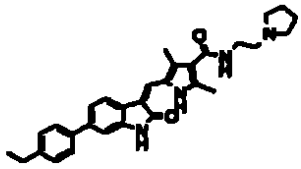
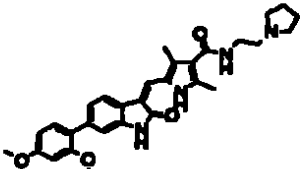
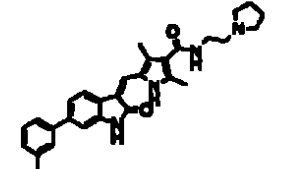
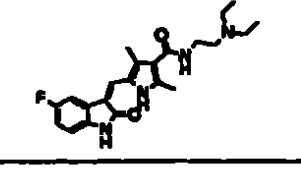
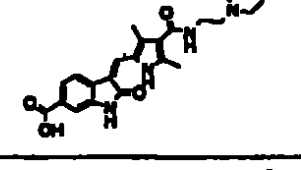
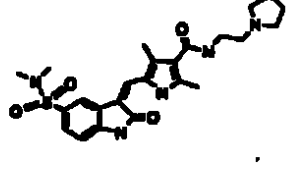
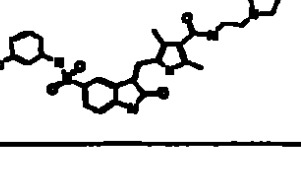
34

52		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
53		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide
54		5-[5-(2-Methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
55		5-[5-(3-Methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
56		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
57		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
58		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide
59		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
60		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-8-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

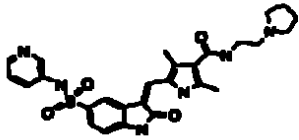
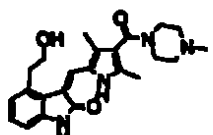
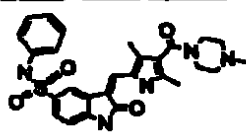
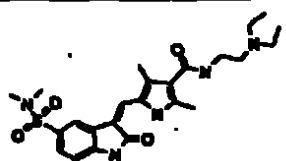
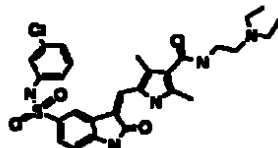
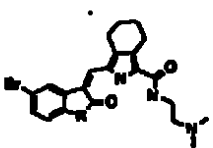
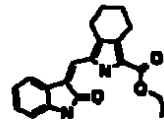
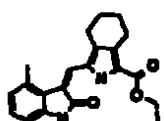
61		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide
62		5-[6-(3,5-Dichloro-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
63		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
64		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
65		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-dimethylamino-propyl)amide
66		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-dimethylamino-propyl)amide
67		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
68		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide

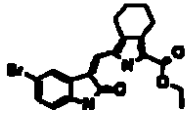
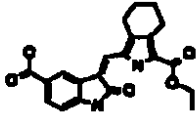
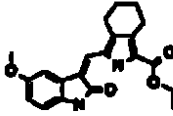
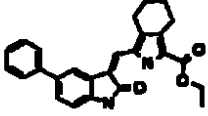
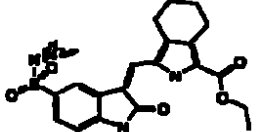
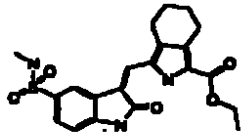
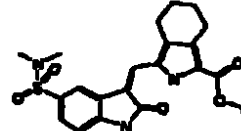
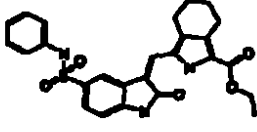
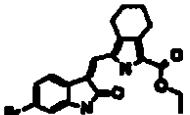
33

69		3-{4-[3-Diethylamino-propylcarbamoyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene}-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-4-carboxylic acid (3-chloro-4-methoxy-phenyl)amide
70		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
71		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
72		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
73		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
74		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (pyridin-4-ylmethyl)amide
75		5-[8-(4-Butyl-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
76		5-[6-(5-Isopropyl-2-methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

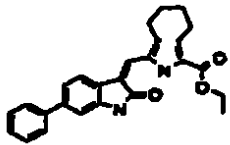
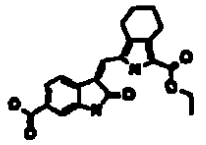
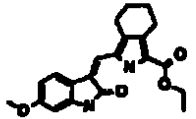
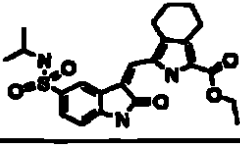
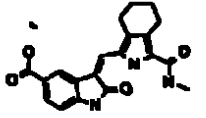
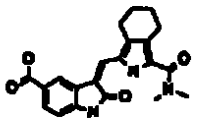
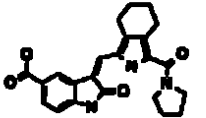
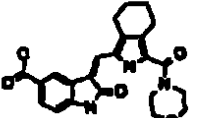
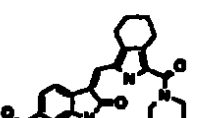
77		5-[5-(4-Ethyl-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenamethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
78		5-[5-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenamethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
79		5-[5-(3-Isopropyl-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenamethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
80		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenamethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
81		3-[4-(2-diethylaminoethylcarbamoyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid
82		5-[5-(5-Dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenamethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
83		5-[5-(3-Chloro-phenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenamethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

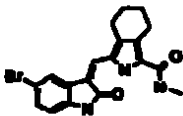
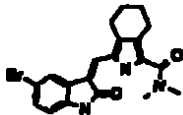
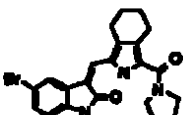
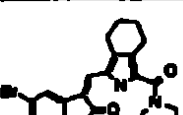
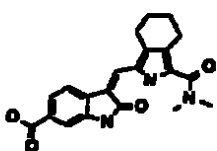
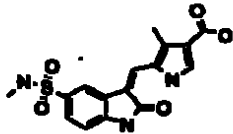
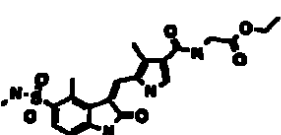
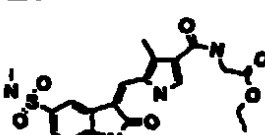
26

84		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-5-(pyridin-3-ylsulfamoyl)-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
85		3-[3,5-Dimethyl-4-(4-methyl-piperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-4-(2-hydroxy-ethyl)-1,3-dihydroindol-2-one
86		3-[3,5-Dimethyl-4-(4-methyl-piperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid phenylamide
87		5-(5-Dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
88		5-[5-(3-Chloro-phenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
89		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)-amide
90		3-(2-Oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
91		3-(4-Methyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester

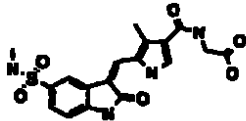
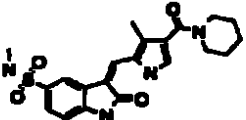
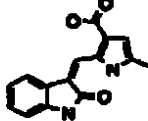
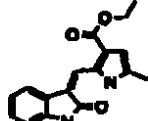
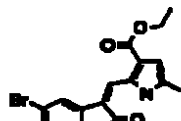
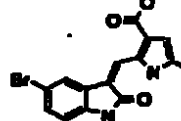
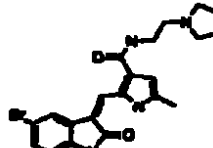
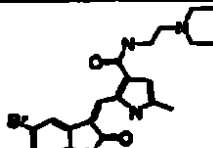
92		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
93		3-(3-Ethoxycarbonyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
94		3-(5-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
95		3-(2-Oxo-5-phenyl-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
96		3-(2-Oxo-5-sulfamoyl-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
97		3-(5-Methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
98		3-(5-Dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
99		3-(2-Oxo-5-phenylsulfamoyl-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
100		3-(6-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester

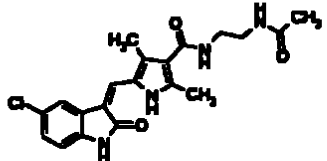
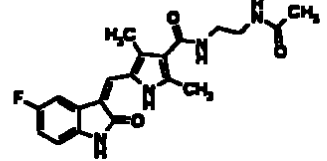
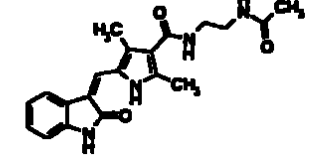
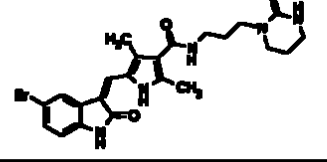
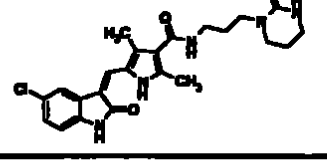
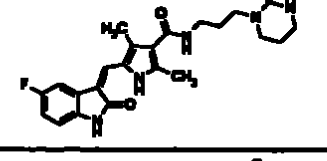
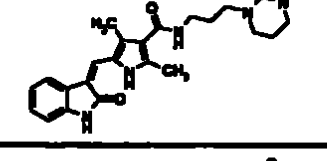
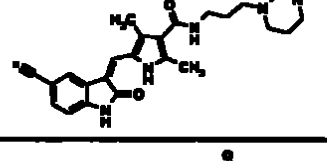
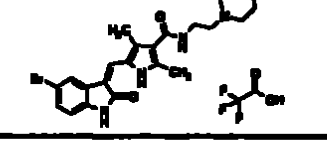
37

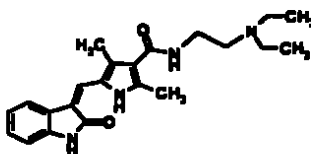
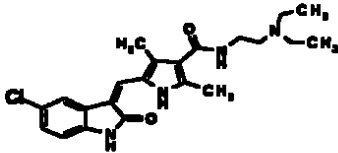
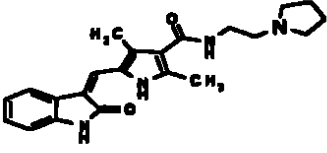
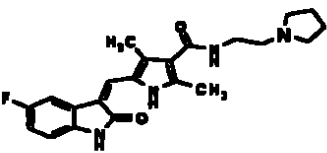
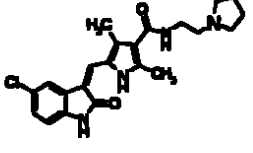
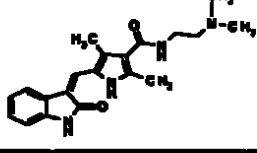
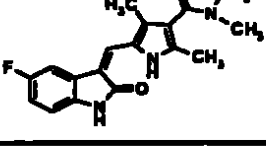
101		3-(2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
102		3-(3-Ethoxycarbonyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid
103		3-(5-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
104		3-(5-Isopropylisulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
105		3-(3-Methylcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
106		3-(3-Dimethylcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
107		2-Oxo-3-[3-(pyrrolidine-1-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene]-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
108		3-(3-(Morpholine-4-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
109		3-(3-(Morpholine-4-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid

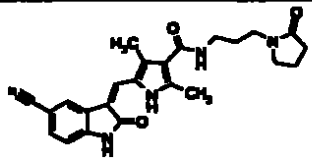
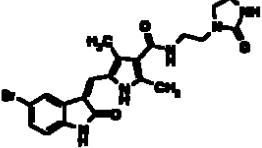
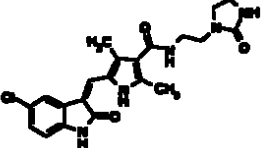
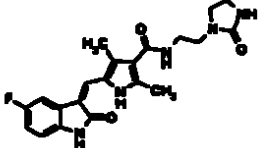
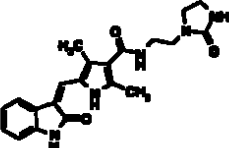
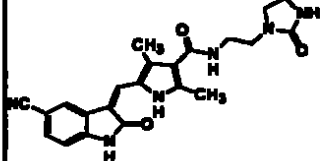
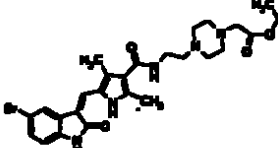
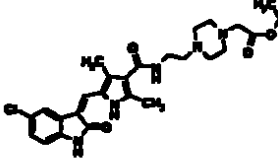
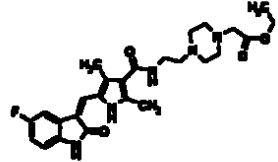
110		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid methylamide
111		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid dimethylamide
112		6-Bromo-3-[3-(pyrrolidine-1-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene]-1,3-dihydro-indol-2-one
113		6-Bromo-3-[3-(morpholine-4-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene]-1,3-dihydro-indol-2-one
114		3-(3-Dimethylcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid
115		4-Methyl-5-(5-methylsulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid
116		[4-Methyl-5-(4-methyl-5-methylsulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl-amino]-acetic acid ethyl ester
117		[4-Methyl-5-(5-methylsulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl-amino]-acetic acid ethyl ester

29

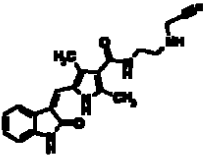
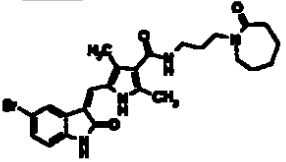
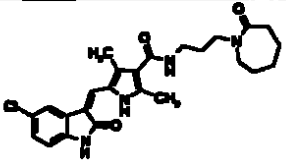
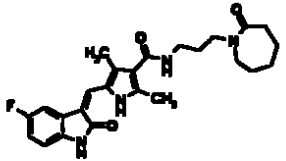
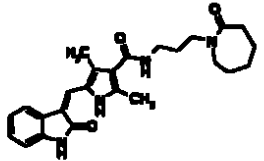
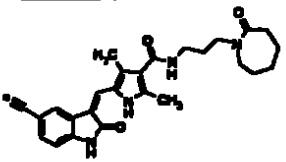
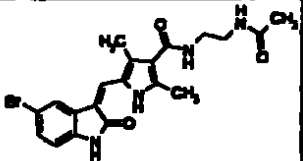
118		(4-Methyl-5-(5-methylisulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-acetic acid
119		3-(3-Methyl-4-(piperidine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid methylamide
120		5-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid
121		5-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester
122		2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester
123		2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid
124		2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide
125		2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide

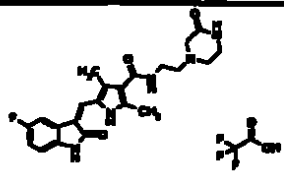
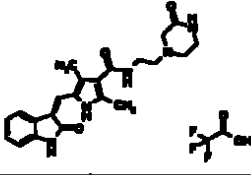
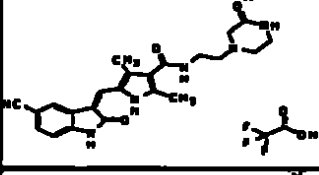
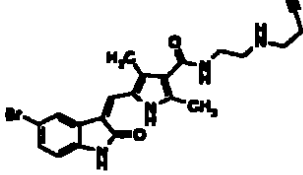
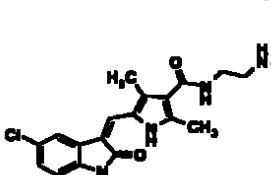
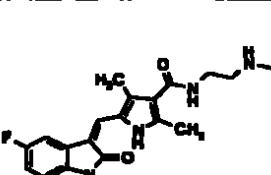
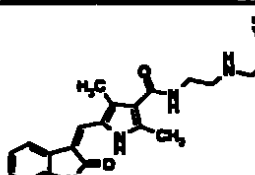
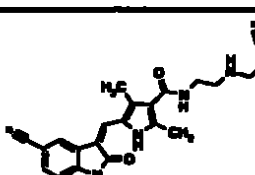
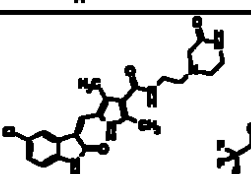
133		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	399 [M-1]	
134		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	383 [M-1]	
135		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	365 [M-1]	
136		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydro-pyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	500 [M+1] 502 [M+1]	
137		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydro-pyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	454 [M-1]	
138		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydro-pyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	438 [M-1]	
139		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydro-pyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	422 [M+1]	
140		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydro-pyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	447 [M+1]	
141		Trifluoro-acetate 4-[2-((5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yridenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium;	486 [M+1] 488 [M+1]	

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	397 [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]	

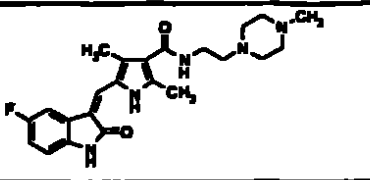
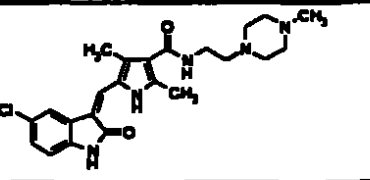
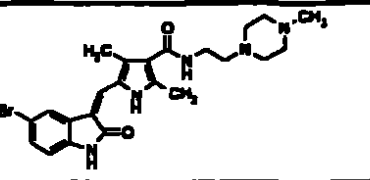
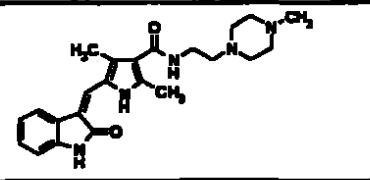
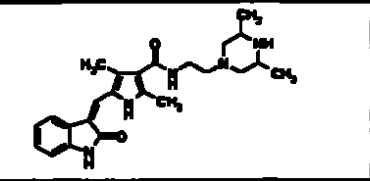
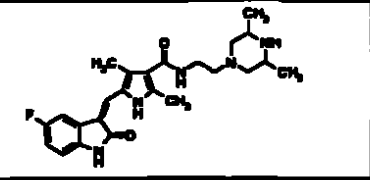
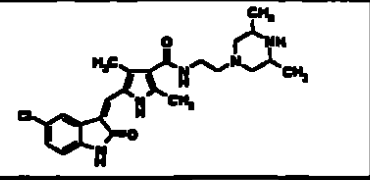
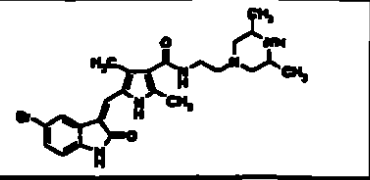
142		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide	430 [M-1]
143		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-oxo-imidazolidin-1-yl)-ethyl]-amide	470 [M-1] 472 [M-1]
144		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-oxo-imidazolidin-1-yl)-ethyl]-amide	392 [M-1]
147		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-piperazin-1-yl}-acetic acid ethyl ester	558 [M+1] 560 [M+1]
149		{4-[2-({5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-piperazin-1-yl}-acetic acid ethyl ester	498 [M+1]

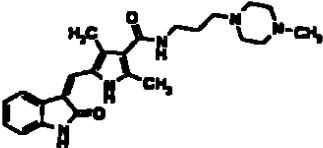
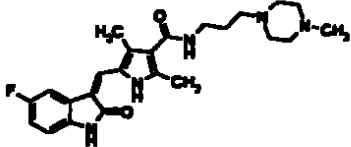
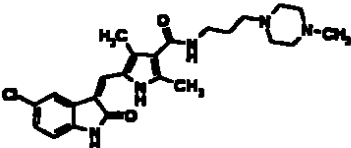
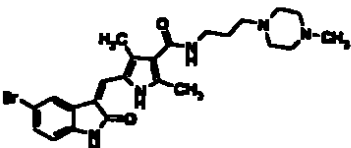
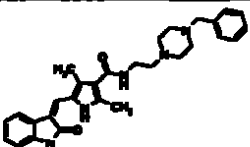
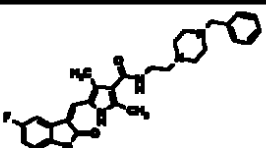
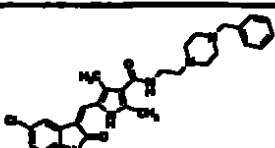
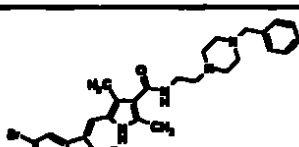
210

153		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(cyanomethyl-amino)-ethyl]-amide	362 [M-1]
154		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	443 [M-1] 445 [M-1]

160		Trifluoro-acetate 4-[2-((5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-cyano-ethylamino)-ethyl]-amide	376 [M-1]
167		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium;	440 [M-1]

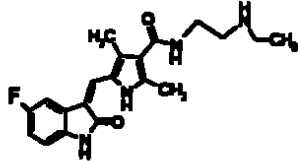
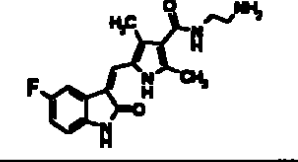
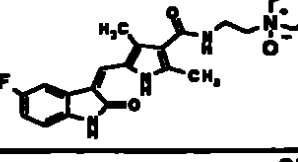
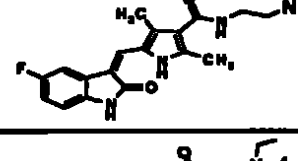
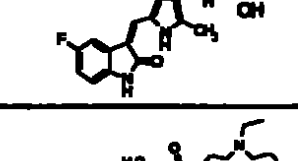
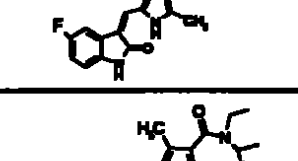
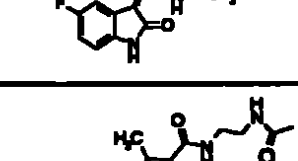
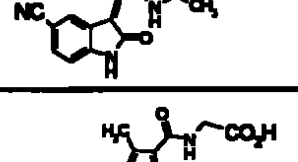
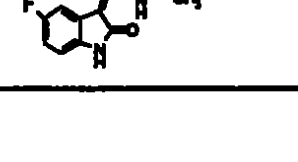
44

168		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	406 [M-1]
172		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	498 [M-1] 500 [M-1]

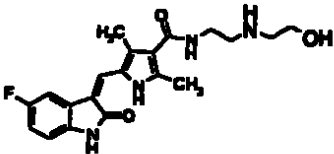
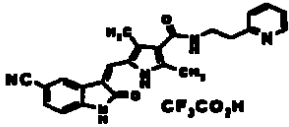
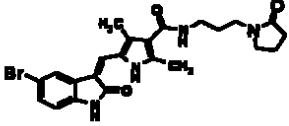
176		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(4-methyl-piperazin-1-yl)-propyl]-amide	422 [M+1]
177		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(4-methyl-piperazin-1-yl)-propyl]-amide	438 [M-1]
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]

42

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

193		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-ethylaminoethyl)-amide
194		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-aminoethyl)-amide
195		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethyl-N-oxoaminoethyl)-amide
196		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-ethyl-N-hydroxyaminoethyl)-amide
197		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-2-hydroxyethyl)-amide
198		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
199		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

283

202 203		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-hydroxyethylamino)ethyl]-amide
		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide trifluoroacetate
204		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-yl-2-onepropyl)-amide trifluoroacetate
205		3-(3,5-dimethylpyrrol-2-ylmethylidene)-1-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-2-indolinone
206		3-(3,5-dimethylpyrrol-2-ylmethylidene)-1-(pyrrolidin-1-ylmethyl)-2-indolinone

The compound numbers correspond to the Example numbers in the Examples section. That is, the synthesis of Compound 1 in Table 1 is described in Example 1. The compounds presented in Table 1 are exemplary only and are not to be construed as limiting the scope of this invention in any manner. Additional protein kinase inhibitors that can be used in this method include 3-(3,5-dimethylpyrrol-2-ylmethylidene)-2-indolinone (su 5416); 3-[3,5-dimethyl-4-(2-carboxyethyl)pyrrol-2-ylmethylidene]-2-indolinone (su 6668), and 3-[3-(2-carboxyethyl)-5-methylpyrrol-2-ylmethylidene]-2-indolinone.

10 B. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors- Compounds of Formulae (II) and (III):

Nonlimiting examples of COX-2 inhibitors that may be used in the present invention are identified in Tables II and III below.

TABLE II

Compound	Trade/ Research Name	Reference	Dosage
1,5-Diphenyl-3-substituted pyrazoles		WO 97/13755	
	radicicol	WO 96/25928. Kwon et al (Cancer Res(1992) 52 6296)	
	GB-02283745		
	TP-72	Cancer Res 1998 58 4 717-723	
1-(4-chlorobenzoyl)-3-[4-(4- fluoro-phenyl)thiazol-2- ylmethyl]-5-methoxy-2-methy lindole	A-183827.0		
	GR-253035		
4-(4-cyclohexyl-2-methyloxazol- 5-yl)-2- fluorobenzenesulfonamide	JTE-522	JP 9052882	
5-chloro-3-(4- (methylsulfonyl)phenyl)-2- (methyl-5-pyridinyl)-pyridine			
2-(3,5-difluoro-phenyl)-3-4- (methylsulfonyl)-phenyl)-2- cyclopenten-1-one			
	L-768277		
	L-783003		
	MK-966; VIOXX®	US 5968974	12.5-100 mg po
Indomethacin-derived indolelactic acid		WO 96/374679	200 mg/kg/day
1-Methylsulfonyl-4-[1,1- dimethyl-4-(4-fluoro- phenyl)cyclopenta-2,4-dien-3- yl]benzene		WO 95/30656. WO 95/30652. WO 96/38418. WO 96/38442.	
4,4-dimethyl-2-phenyl-3-[4- (methylsulfonyl)phenyl]cyclo-			

24

Compound	Trade/ Research Name	Reference	Dosage
butenone			
2-(4-methoxyphenyl)-4-methyl- 1-(4-sulfamoylphenyl)-pyrrole		EP 799823	
N-[5-(4-fluoro)phenoxy]thiophene-2- methanesulfonamide	RWJ-63556		
5(E)-(3,5-di-tert-butyl-4- hydroxy)benzylidene-2-ethyl- 1,2-isothiazolidine-1,1-dioxide	S-2474	EP 595546	
3-formylamino-7- methylsulfonylamino-6- phenoxy-4H-1-benzopyran-4- one	T-614	DE 38/34204	
Benzenesulfonamide, 4-(5-(4- methylphenyl)-3- (trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1- yl)-	celecoxib	US 5466823	
CS 502	(Sankyo)		
2-[(2-chloro-6- fluorophenyl)amino]-5- methylbenzeneacetic acid	lumiracoxib (Cox-189)	WO 99/11605	
5-chloro-6'-methyl-3-[4- (methylsulfonyl)phenyl]-2,3'- bipyridine	etoricoxib (MK 663)	WO 98/03484	
	BMS 34070	US 6180651	
	meloxicam	US 4233299	15-30 mg/day
	nimesulide	US 3840597	

TABLE III

WO 99/30721	WO 99/30729	US 5760068	WO 98/15528
WO 99/25695	WO 99/24404	WO 99/23087	FR 27/71005
EP 921119	FR 27/70131	WO 99/18960	WO 99/15505
WO 99/15503	WO 99/14205	WO 99/14195	WO 99/14194
WO 99/13799	GB 23/30833	US 5859036	WO 99/12930
WO 99/11605	WO 99/10332	WO 99/10331	WO 99/09988
US 5869524	WO 99/05104	US 5859257	WO 98/47890
WO 98/47871	US 5830911	US 5824699	WO 98/45294
WO 98/43966	WO 98/41511	WO 98/41864	WO 98/41516
WO 98/37235	EP 86/3134	JP 10/175861	US 5776967
WO 98/29382	WO 98/25896	ZA 97/04806	EP 84/6,689
WO 98/21195	GB 23/19772	WO 98/11080	WO 98/06715
WO 98/06708	WO 98/07425	WO 98/04527	WO 98/03484
FR 27/51966	WO 97/38986	WO 97/46524	WO 97/44027
WO 97/34882	US 5681842	WO 97/37984	US 5686460
WO 97/36863	WO 97/40012	WO 97/36497	WO 97/29776
WO 97/29775	WO 97/29774	WO 97/28121	WO 97/28120
WO 97/27181	WO 95/11883	WO 97/14691	WO 97/13755
WO 97/13755	CA 21/80624	WO 97/11701	WO 96/41645
WO 96/41626	WO 96/41625	WO 96/38418	WO 96/37467
WO 96/37469	WO 96/36623	WO 96/36617	WO 96/31509
WO 96/25405	WO 96/24584	WO 96/23786	WO 96/19469
WO 96/16934	WO 96/13483	WO 96/03385	US 5510368
WO 96/09304	WO 96/06840	WO 96/06840	WO 96/03387
WO 95/21817	GB 22/83745	WO 94/27980	WO 94/26731
WO 94/20480	WO 94/13635	FR 27/70,131	US 5859036
WO 99/01131	WO 99/01455	WO 99/01452	WO 99/01130
WO 98/57966	WO 98/53814	WO 98/53818	WO 98/53817
WO 98/47890	US 5830911	US 5776967	WO 98/22101
DE 19/753463	WO 98/21195	WO 98/16227	US 5733909
WO 98/05639	WO 97/44028	WO 97/44027	WO 97/40012
WO 97/38986	US 5677318	WO 97/34882	WO 97/16435

2/5

WO 97/03678	WO 97/03667	WO 96/36623	WO 96/31509
WO 96/25928	WO 96/06840	WO 96/21667	WO 96/19469
US 5510368	WO 96/09304	GB 22/83745	WO 96/03392
WO 94/25431	WO 94/20480	WO 94/13635	JP 09052882
GB 22/94879	WO 95/15316	WO 95/15315	WO 96/03388
WO 96/24585	US 5344991	WO 95/00501	US 5968974
US 5945539	US 5994381	US 6180651	

5 Pyrazoles can be prepared by methods described in WO 95/15316. Pyrazoles can further be prepared by methods described in WO 95/15315. Pyrazoles can also be prepared by methods described in WO 96/03385. Thiophene analogs can be prepared by methods described in WO 95/00501. Preparation of thiophene analogs is also described in WO 94/15932. Oxazoles can be prepared by the methods described in WO 95/00501. Preparation of oxazoles is also described in WO 94/27980. Isoxazoles can be prepared by the methods described in WO 96/25405. Imidazoles can be prepared by the methods described in WO 96/03388. Preparation of imidazoles is also described in WO 96/03387. Cyclopentene cyclooxygenase-2 inhibitors can be prepared by the methods described in U.S. Patent No. 5,344,991. Preparation of cyclopentane Cox-2 inhibitors is also described in WO 95/00501. Terphenyl compounds can be prepared by the methods described in WO 96/16934. Thiazole compounds can be prepared by the methods described in WO 96/03,392. Pyridine compounds can be prepared by the methods described in WO 96/03392. Preparation of pyridine compounds is also described in

10 WO 96/24585.

The celecoxib used in the therapeutic combinations of the present invention can be prepared in the manner set forth in U.S. Patent No. 5,466,823.

The valdecoxib used in the therapeutic combinations of the present invention can be prepared in the manner set forth in U.S. Patent No. 5,633,272.

20 The parecoxib used in the therapeutic combinations of the present invention can be prepared in the manner set forth in U.S. Patent No. 5,932,598.

The rofecoxib used in the therapeutic combinations of the present invention can be prepared in the manner set forth in U.S. Patent No. 5,968,974.

25 The Japan Tobacco JTE-522 used in the therapeutic combinations of the present invention can be prepared in the manner set forth in JP 90/52,882.

The lumiracoxib (Cox-189) used in the therapeutic combinations of the present invention can be prepared in the manner set forth in WO 99/11605.

The etoricoxib (MK 663) used in the therapeutic combinations of the present invention can be prepared in the manner set forth in WO 98/03484.

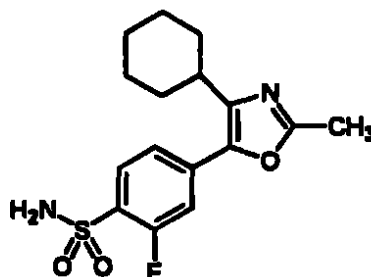
Bristol Meyers Squibb's BMS 34070 used in the therapeutic combinations of the present invention can be prepared in the manner set forth in U.S. Patent No. 6,180,651.

5 The above references listed in Tables II and III above describe various COX-2 inhibitors suitable for use in the present invention described herein, and processes for their manufacture, are hereby individually incorporated by reference.

Preferred COX-2 inhibitors that may be used in the present invention include, but are not limited to:

10

C1)



JTE-522, 4-(4-cyclohexyl-2-methyloxazol-5-yl)-2-fluorobenzenesulfonamide;

15

C2)

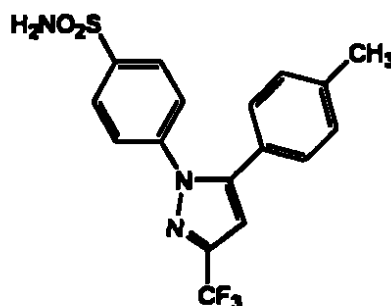
5-chloro-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-(methyl-5-pyridinyl)pyridine;

C3)

2-(3,5-difluorophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-cyclopenten-1-one;

20

C4)

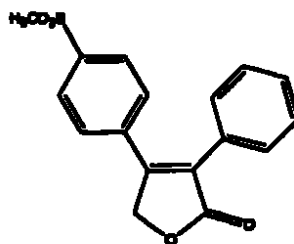


4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide;

25

216

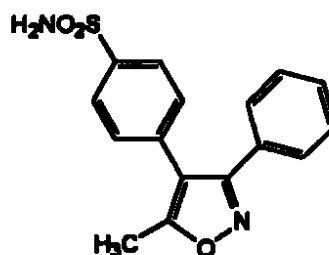
C5)



rofecoxib, 4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone;

5

C6)



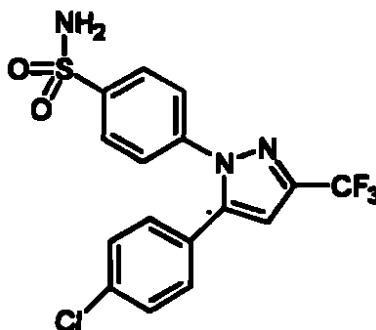
4-(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)benzenesulfonamide;

C7)

10

N-[[4-(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)phenyl]sulfonyl]propanamide;

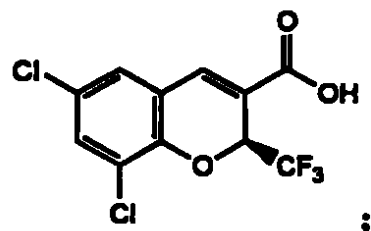
C8)



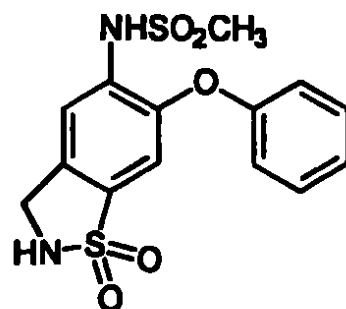
4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-1-yl]benzenesulfonamide;

15

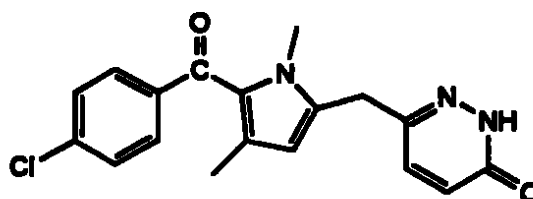
C9)



C10)

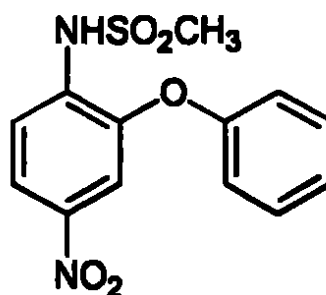


C11)



6-[[5-(4-chlorobenzoyl)-1,4—dimethyl-1H-pyrrol-2-yl]methyl]-3(2H)-pyridazinone;

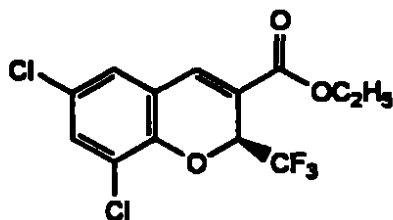
C12)



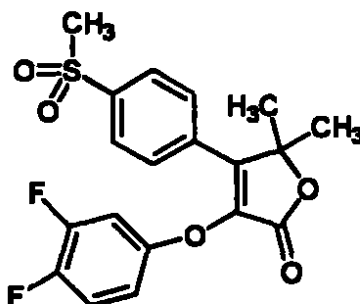
N-(4-nitro-2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide;

28

C13)



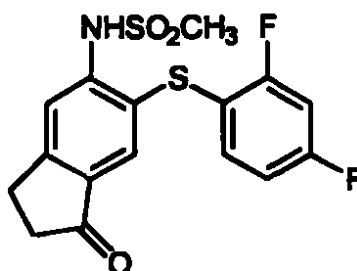
C14)



5

3-(3,4-difluorophenoxy)-5,5-dimethyl-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-2(5H)-furanone;

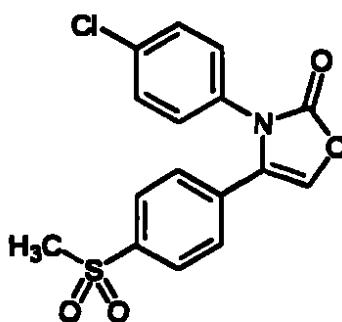
C15)



10

N-[6-[(2,4-difluorophenyl)thio]-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl]methanesulfonamide;

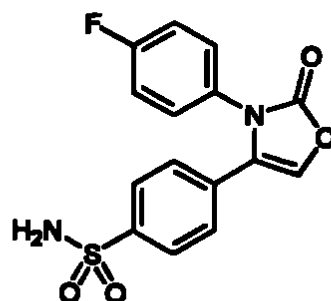
C16)



15

3-(4-chlorophenyl)-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-2(3H)-oxazolone;

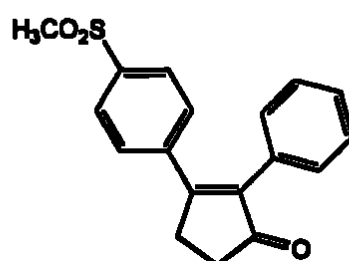
C17)



4-[3-(4-fluorophenyl)-2,3-dihydro-2-oxo-4-oxazolyl]benzenesulfonamide;

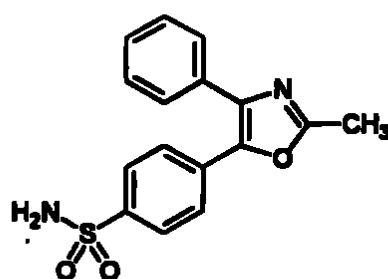
5

C18)



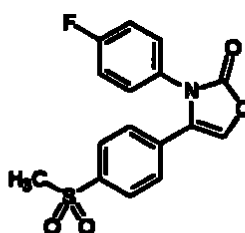
3-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-2-phenyl-2-cyclopenten-1-one;

C19)



4-(2-methyl-4-phenyl-5-oxazolyl)benzenesulfonamide;

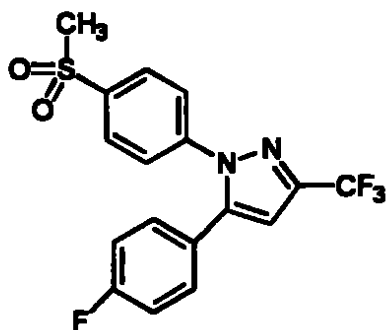
C20)



3-(4-fluorophenyl)-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-2(3H)-oxazolone.

48

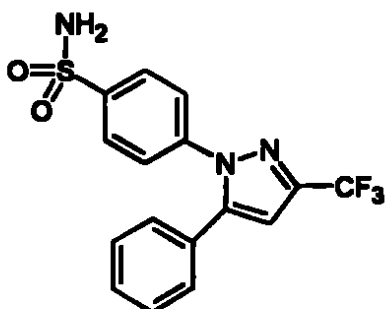
C21)



5-(4-fluorophenyl)-1-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole;

5

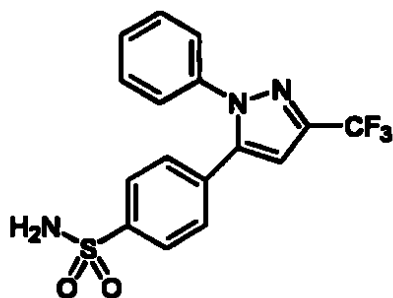
C22)



4-[5-phenyl]-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-ylbenzenesulfonamide;

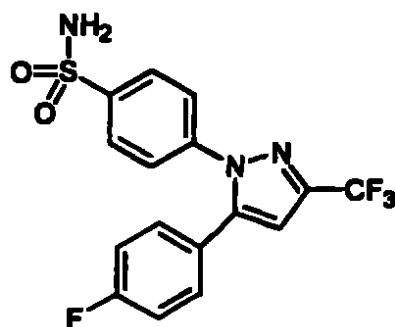
10

C23)



4-[1-phenyl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]benzenesulfonamide;

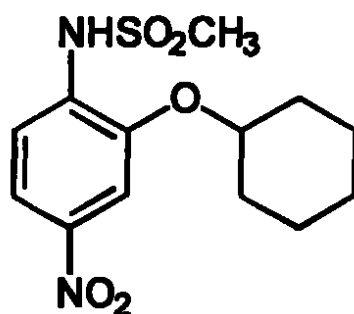
C24)



4-[5-(4-fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide;

5

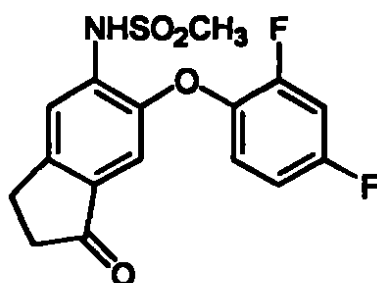
C25)



N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methanesulfonamide;

10

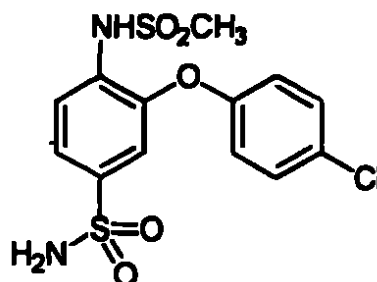
C26)



N-[6-(2,4-difluorophenoxy)-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl]methanesulfonamide;

49

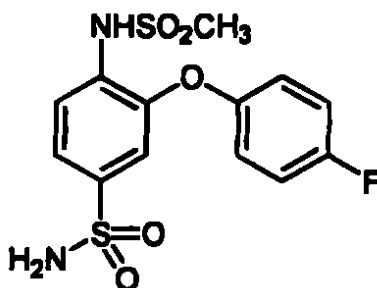
C27)



3-(4-chlorophenoxy)-4-[(methylsulfonyl)amino]benzenesulfonamide;

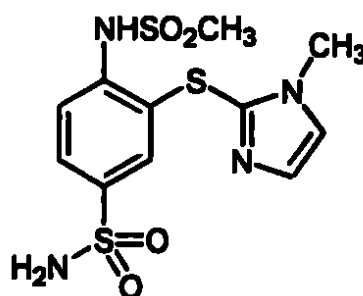
5

C28)



3-(4-fluorophenoxy)-4-[(methylsulfonyl)amino]benzenesulfonamide;

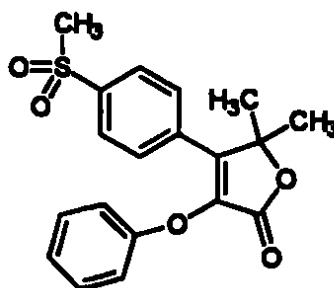
C29)



3-[(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)thio]-4-[(methylsulfonyl)amino]benzenesulfonamide;

10

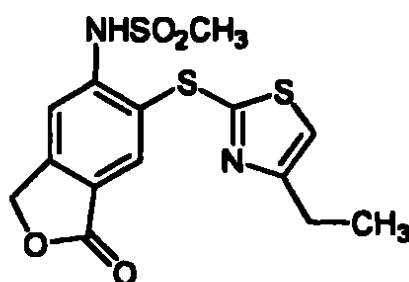
C30)



5,5-dimethyl-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-3-phenoxy-2(5H)-furanone;

5

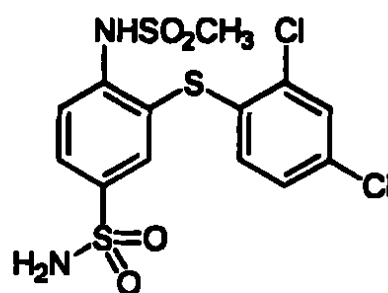
C31)



N-[6-[(4-ethyl-2-thiazolyl)thio]-1,3-dihydro-1-oxo-5-isobenzofuranyl]methanesulfonamide;

10

C32)

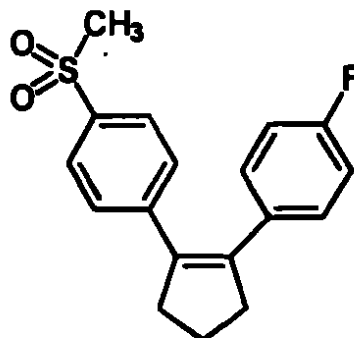


3-[(2,4-dichlorophenyl)thio]-4-[(methylsulfonyl)amino]benzenesulfonamide;

15

50

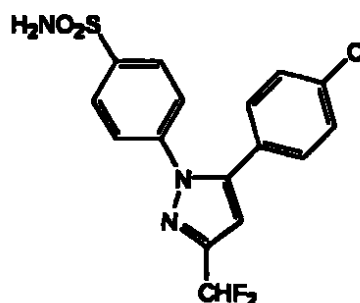
C33)



1-fluoro-4-[2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]cyclopenten-1-yl]benzene;

5

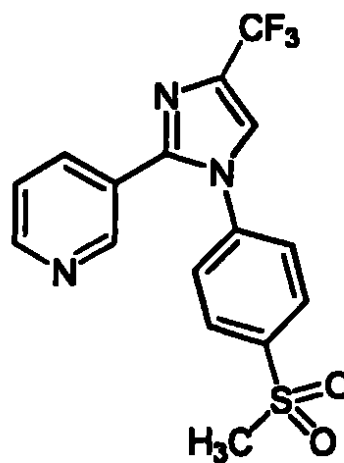
C34)



4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(difluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide;

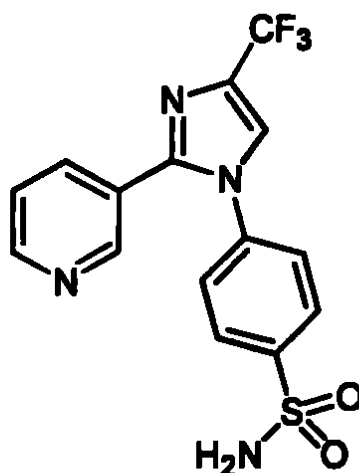
10

C35)



3-[1-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-4-(trifluoromethyl)-1H-imidazol-2-yl]pyridine;

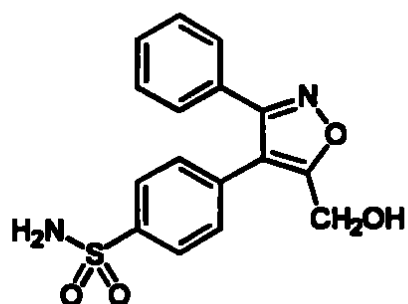
C36)



4-[2-(3-pyridinyl)-4-(trifluoromethyl)-1H-imidazol-1-yl]benzenesulfonamide;

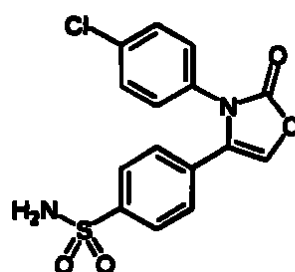
5

C37)



4-[5-(hydroxymethyl)-3-phenylisoxazol-4-yl]benzenesulfonamide;

C38)

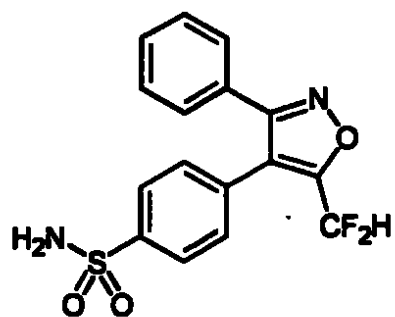


10

4-[3-(4-chlorophenyl)-2,3-dihydro-2-oxo-4-oxazolyl]benzenesulfonamide;

58

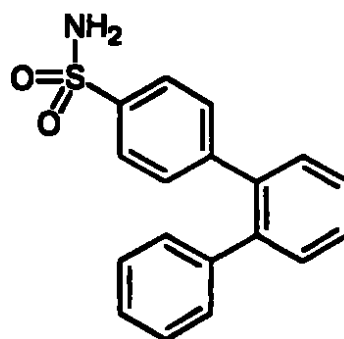
C39)



4-[5-(difluoromethyl)-3-phenylisoxazol-4-yl]benzenesulfonamide;

5

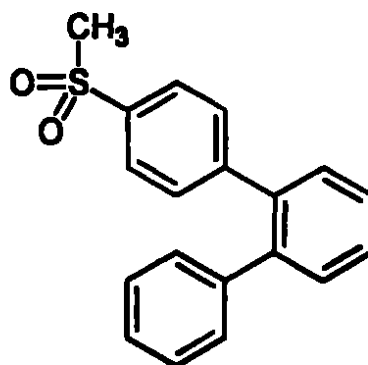
C40)



[1,1':2',1''-terphenyl]-4-sulfonamide;

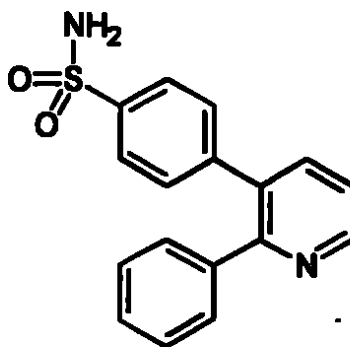
10

C41)



4-(methylsulfonyl)-1,1',2',1''-terphenyl;

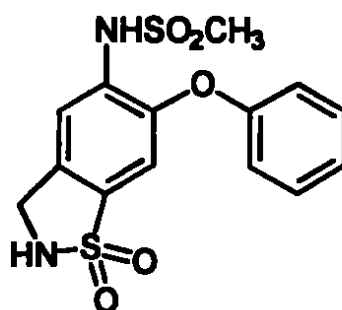
C42)



4-(2-phenyl-3-pyridinyl)benzenesulfonamide;

5

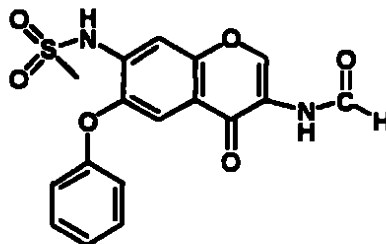
C43)



N-(2,3-dihydro-1,1-dioxo-6-phenoxy-1,2-benzisothiazol-5-yl)methanesulfonamide; and

10

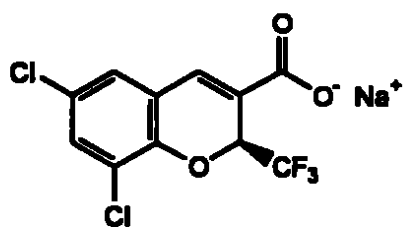
C44)



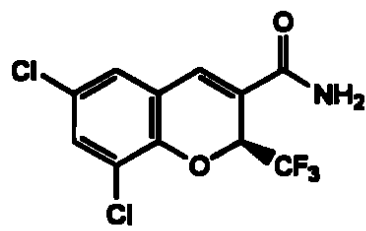
N-[3-(formylamino)-4-oxo-6-phenoxy-4H-1-benzopyran-7-yl]methanesulfonamide;

52

C45)

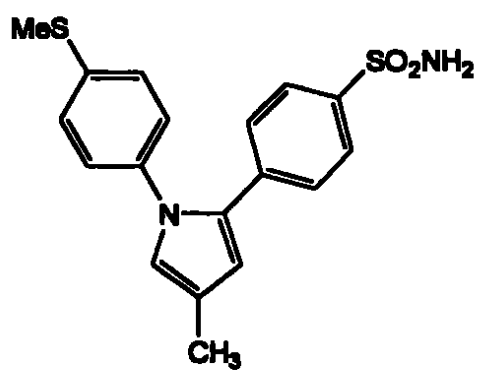


C46)



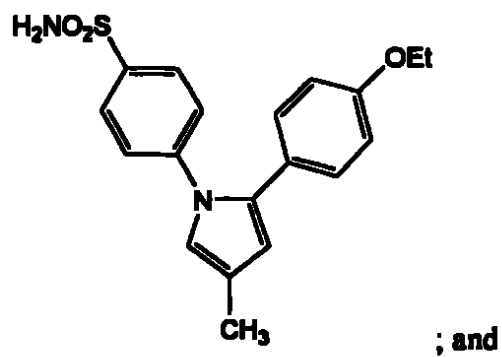
5

C47)



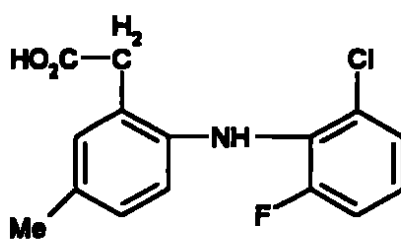
10

C48)



; and

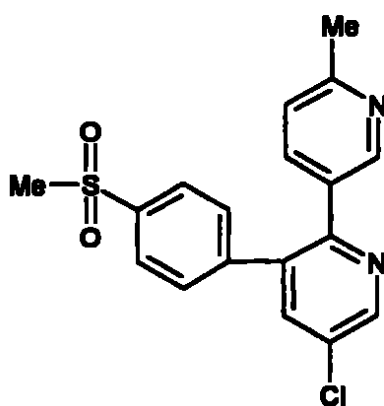
C49) lumiracoxib (COX-189)



2-[(2-chloro-6-fluorophenyl)amino]-5-methylbenzeneacetic acid

5

C50) etoricoxib (MK 663)



10

5-chloro-6'-methyl-3-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-2,3'-bipyridine

C51) BMS 34070

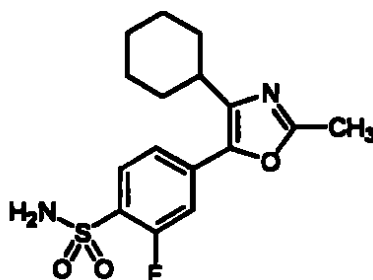


15



More preferred COX-2 inhibitors that may be used in the present invention are selected from the group consisting of:

I)



JTE-522, 4-(4-cyclohexyl-2-methyloxazol-5-yl)-2-fluorobenzenesulfonamide;

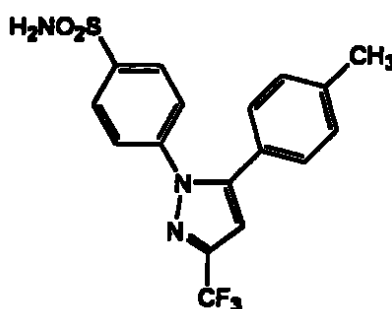
II)

5-chloro-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-(methyl-5-pyridinyl)pyridine;

III)

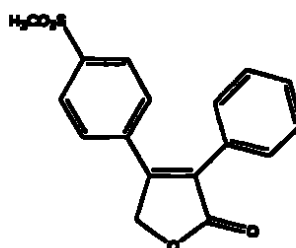
2-(3,5-difluorophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-cyclopenten-1-one;

IV)



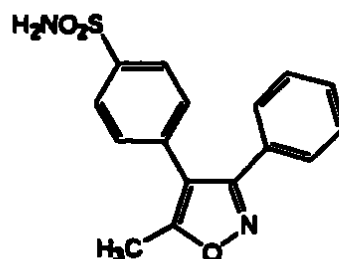
4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide;

V)



rofecoxib, 4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone;

VI)



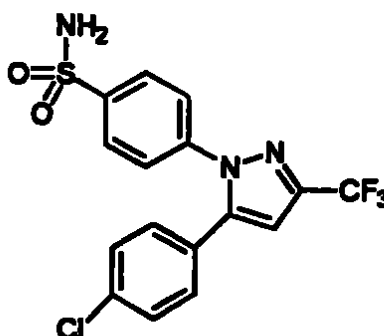
4-(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)benzenesulfonamide;

5

VII)

N-[[4-(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)phenyl]sulfonyl]propanamide;

VIII)

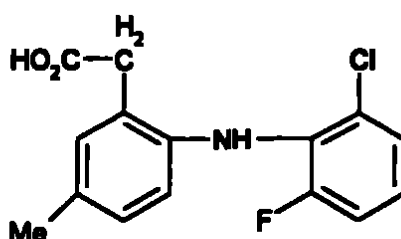


10

4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-1-yl]benzenesulfonamide; and

IX) lumiracoxib (COX-189)

15



2-[(2-chloro-6-fluorophenyl)amino]-5-methylbenzeneacetic acid

20

Still more preferably, the COX-2 inhibitors that may be used in the present invention include, but are not limited to celecoxib, valdecoxib, parecoxib, rofecoxib, lumiracoxib and Japan Tobacco JTE-522.

SH

Also included in the combination of the invention are the isomeric forms, prodrugs and tautomers of the described compounds and the pharmaceutically-acceptable salts thereof. Illustrative pharmaceutically acceptable salts are prepared from formic, acetic, propionic, succinic, glycolic, gluconic, lactic, malic, tartaric, citric, ascorbic, glucuronic, maleic, fumaric, pyruvic, aspartic, glutamic, benzoic, anthranilic, mesylic, stearic, salicylic, p-hydroxybenzoic, phenylacetic, mandelic, embonic (pamoic), methanesulfonic, ethanesulfonic, benzenesulfonic, pantothenic, toluenesulfonic, 2-hydroxyethanesulfonic, sulfanilic, cyclohexylaminosulfonic, algenic, b-hydroxybutyric, galactaric and galacturonic acids.

10

Utility

The compounds of the present invention are inhibitor of protein kinases (PKs) and cyclooxygenase enzyme, in particular cyclooxygenase-2 enzyme, and are therefore useful in the treatment of cancer.

The PKs whose catalytic activity is modulated by the compounds of Formula (I) of this invention include protein tyrosine kinases such as receptor tyrosine kinases (RTKs), cellular tyrosine kinases (CTKs), and serine-threonine kinases (STKs). RTK mediated signal transduction is initiated by extracellular interaction with a specific growth factor (ligand), followed by receptor dimerization, transient stimulation of the intrinsic protein tyrosine kinase activity and phosphorylation. Binding sites are thereby created for intracellular signal transduction molecules and lead to the formation of complexes with a spectrum of cytoplasmic signaling molecules that facilitate the appropriate cellular response (e.g., cell division, metabolic effects on the extracellular microenvironment, etc.). See, Schlessinger and Ullrich, 1992, Neuron 9:303-391.

It has been shown that tyrosine phosphorylation sites on growth factor receptors function as high-affinity binding sites for SH2 (src homology) domains of signaling molecules. 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, and Koch *et al.*, 1991, Science 252:668-678. Several intracellular substrate proteins that associate with RTKs have been identified. They may be divided into two principal groups: (1) substrates that have a catalytic domain, and (2) substrates which lack such domain but which serve as adapters and associate with catalytically active molecules. Songyang *et al.*, 1993, Cell 72:767-778. The specificity of the interactions between receptors and SH2 domains of their substrates is determined by the amino acid residues immediately surrounding the phosphorylated tyrosine residue. Differences in the binding affinities between SH2 domains and the amino acid sequences surrounding the phosphotyrosine residues on particular receptors are consistent with the observed differences in

their substrate phosphorylation profiles. Songyang *et al.*, 1993, Cell 72:767-778. These observations suggest that the function of each RTK is determined not only by its pattern of expression and ligand availability but also by the array of downstream signal transduction pathways that are activated by a particular receptor. Thus, phosphorylation provides an important regulatory step which determines the selectivity of signaling pathways recruited by specific growth factor receptors, as well as differentiation factor receptors.

STKs, being primarily cytosolic, affect the internal biochemistry of the cell, often as a down-line response to a PTK event. STKs have been implicated in the signaling process which initiates DNA synthesis and subsequent mitosis leading to cell proliferation.

Thus, PK signal transduction results in, among other responses, cell proliferation, differentiation, growth and metabolism. Abnormal cell proliferation may result in a wide array of disorders and diseases, including the development of neoplasia such as carcinoma, sarcoma, glioblastoma and hemangioma, disorders such as leukemia, psoriasis, arteriosclerosis, arthritis and diabetic retinopathy and other disorders related to uncontrolled angiogenesis and/or vasculogenesis.

A precise understanding of the mechanism by which the compounds of this invention inhibit PKs is not required in order to practice the present invention. However, while not hereby being bound to any particular mechanism or theory, it is believed that the compounds of Formula (I) interact with the amino acids in the catalytic region of PKs. PKs typically possess a bi-lobate structure wherein ATP appears to bind in the cleft between the two lobes in a region where the amino acids are conserved among PKs. Inhibitors of PKs are believed to bind by non-covalent interactions such as hydrogen bonding, van der Waals forces and ionic interactions in the same general region where the aforesaid ATP binds to the PKs. More specifically, it is thought that the 2-indolinone component of the compounds of Formula (I) binds in the general space normally occupied by the adenine ring of ATP. Specificity of a particular molecule for a particular PK may then arise as the result of additional interactions between the various substituents on the 2-indolinone core and the amino acid domains specific to particular PKs. Thus, different indolinone substituents may contribute to preferential binding to particular PKs. The ability to select compounds active at different ATP (or other nucleotide) binding sites makes the compounds of Formula (I) useful for targeting any protein with such a site. The compounds of Formula (I) disclosed herein thus have utility in *in vitro* assays for such proteins as well as exhibiting *in vivo* therapeutic effects through interaction with such proteins.

Additionally, the compounds of Formula (I) provide a therapeutic approach to the treatment of many kinds of solid tumors, including but not limited to carcinomas, sarcomas

including Kaposi's sarcoma, erythroblastoma, glioblastoma, meningioma, astrocytoma, melanoma and myoblastoma. Treatment or prevention of non-solid tumor cancers such as leukemia are also contemplated by this invention. Indications may include, but are not limited to brain cancers, bladder cancers, ovarian cancers, gastric cancers, pancreas cancers, colon
5 cancers, blood cancers, lung cancers and bone cancers.

Further examples, without limitation, of the types of disorders related to inappropriate PK activity that the compounds of present invention may be useful in preventing, treating and studying, are cell proliferative disorders, fibrotic disorders and metabolic disorders.

Cell proliferative disorders, which may be prevented, treated or further studied by the
10 present invention include cancer, blood vessel proliferative disorders and mesangial cell proliferative disorders.

Blood vessel proliferative disorders refer to disorders related to abnormal vasculogenesis (blood vessel formation) and angiogenesis (spreading of blood vessels). While vasculogenesis and angiogenesis play important roles in a variety of normal physiological
15 processes such as embryonic development, corpus luteum formation, wound healing and organ regeneration, they also play a pivotal role in cancer development where they result in the formation of new capillaries needed to keep a tumor alive. Other examples of blood vessel proliferation disorders include arthritis, where new capillary blood vessels invade the joint and destroy cartilage, and ocular diseases, like diabetic retinopathy, where new capillaries in the
20 retina invade the vitreous, bleed and cause blindness.

Two structurally related RTKs have been identified to bind VEGF with high affinity: the fms-like tyrosine 1 (flt-1) receptor (Shibuya *et al.*, 1990, Oncogene, 5:519-524; De Vries *et al.*, 1992, Science, 255:989-991) and the KDR/FLK-1 receptor, also known as VEGF-R2. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been reported to be an endothelial cell specific
25 mitogen with *in vitro* endothelial cell growth promoting activity. Ferrara & Henzel, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm., 161:851-858; Vaisman *et al.*, 1990, J. Biol. Chem., 265:19461-19566. Information set forth in U.S. application Ser. Nos. 08/193,829, 08/038,596 and 07/975,750, strongly suggest that VEGF is not only responsible for endothelial cell proliferation, but also is the prime regulator of normal and pathological angiogenesis. See
30 generally, Klagsburn & Soker, 1993, Current Biology, 3(10):699-702; Houck, *et al.*, 1992, J. Biol. Chem., 267:26031-26037.

Normal vasculogenesis and angiogenesis play important roles in a variety of physiological processes such as embryonic development, wound healing, organ regeneration and female reproductive processes such as follicle development in the corpus luteum during
35 ovulation and placental growth after pregnancy. Folkman & Shing, 1992, J. Biological Chem.,

267(16):10931-34. Uncontrolled vasculogenesis and/or angiogenesis has been associated with diseases such as diabetes as well as with malignant solid tumors that rely on vascularization for growth. 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.

5 The surmised role of VEGF in endothelial cell proliferation and migration during angiogenesis and vasculogenesis indicates an important role for the KDR/FLK-1 receptor in these processes. Diseases such as diabetes mellitus (Folkman, 198, in XIth Congress of Thrombosis and Haemostasis (Verstraeta, *et al.*, eds.), pp. 583-596, Leuven University Press, Leuven) and arthritis, as well as malignant tumor growth may result from uncontrolled
10 angiogenesis. See e.g., Folkman, 1971, N. Engl. J. Med., 285:1182-1186. The receptors to which VEGF specifically binds are an important and powerful therapeutic target for the regulation and modulation of vasculogenesis and/or angiogenesis and a variety of severe diseases which involve abnormal cellular growth caused by such processes. Plowman, *et al.*, 1994, DN&P, 7(6):334-339. More particularly, the KDR/FLK-1 receptor's highly specific role
15 in neovascularization make it a choice target for therapeutic approaches to the treatment of cancer and other diseases which involve the uncontrolled formation of blood vessels.

Thus, the present invention provides compounds capable of regulating and/or modulating tyrosine kinase signal transduction including KDR/FLK-1 receptor signal transduction in order to inhibit or promote angiogenesis and/or vasculogenesis, that is,
20 compounds that inhibit, prevent, or interfere with the signal transduced by KDR/FLK-1 when activated by ligands such as VEGF. Although it is believed that the compounds of the present invention act on a receptor or other component along the tyrosine kinase signal transduction pathway, they may also act directly on the tumor cells that result from uncontrolled angiogenesis.

25 Although the nomenclature of the human and murine counterparts of the generic "flk-1" receptor differ, they are, in many respects, interchangeable. The murine receptor, Flk-1, and its human counterpart, KDR, share a sequence homology of 93.4% within the intracellular domain. Likewise, murine FLK-1 binds human VEGF with the same affinity as mouse VEGF, and accordingly, is activated by the ligand derived from either species. Millauer *et al.*, 1993,
30 Cell, 72:835-846; Quinn *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7533-7537. FLK-1 also associates with and subsequently tyrosine phosphorylates human RTK substrates (e.g., PLC- γ or p85) when co-expressed in 293 cells (human embryonal kidney fibroblasts).

Models which rely upon the FLK-1 receptor therefore are directly applicable to understanding the KDR receptor. For example, use of the murine FLK-1 receptor in methods
35 which identify compounds that regulate the murine signal transduction pathway are directly

56

applicable to the identification of compounds which may be used to regulate the human signal transduction pathway, that is, which regulate activity related to the KDR receptor. Thus, chemical compounds identified as inhibitors of KDR/FLK-1 *in vitro*, can be confirmed in suitable *in vivo* models. Both *in vivo* mouse and rat animal models have been demonstrated to be of excellent value for the examination of the clinical potential of agents acting on the KDR/FLK-1 induced signal transduction pathway.

Thus, the present invention provides compounds that regulate, modulate and/or inhibit vasculogenesis and/or angiogenesis by affecting the enzymatic activity of the KDR/FLK-1 receptor and interfering with the signal transduced by KDR/FLK-1. Thus the present invention provides a therapeutic approach to the treatment of many kinds of solid tumors including, but not limited to, glioblastoma, melanoma and Kaposi's sarcoma, and ovarian, lung, mammary, prostate, pancreatic, colon and epidermoid carcinoma. In addition, data suggests the administration of compounds which inhibit the KDR/Flk-1 mediated signal transduction pathway may also be used in the treatment of hemangioma, restenosis and diabetic retinopathy.

Furthermore, this invention relates to the inhibition of vasculogenesis and angiogenesis by other receptor-mediated pathways, including the pathway comprising the flt-1 receptor.

Receptor tyrosine kinase mediated signal transduction is initiated by extracellular interaction with a specific growth factor (ligand), followed by receptor dimerization, transient stimulation of the intrinsic protein tyrosine kinase activity and autophosphorylation. Binding sites are thereby created for intracellular signal transduction molecules which leads to the formation of complexes with a spectrum of cytoplasmic signalling molecules that facilitate the appropriate cellular response, e.g., cell division and metabolic effects to the extracellular microenvironment. See, Schlessinger and Ullrich, 1992, Neuron, 9:1-20.

The close homology of the intracellular regions of KDR/FLK-1 with that of the PDGF- β receptor (50.3% homology) and/or the related flt-1 receptor indicates the induction of overlapping signal transduction pathways. For example, for the PDGF- β receptor, members of the src family (Twamley *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7696-7700), phosphatidylinositol-3'-kinase (Hu *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol., 12:981-990), phospholipase C (Kashishian & Cooper, 1993, Mol. Cell. Biol., 4:49-51), ras-GTPase-activating protein, (Kashishian *et al.*, 1992, EMBO J., 11:1373-1382), PTP-ID/syp (Kazlauskas *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6939-6943), Grb2 (Arvidsson *et al.*, 1994, Mol. Cell. Biol., 14:6715-6726), and the adapter molecules Shc and Nck (Nishimura *et al.*, 1993, Mol. Cell. Biol., 13:6889-6896), have been shown to bind to regions involving different autophosphorylation sites. See generally, Claesson-Welsh, 1994, Prog. Growth Factor Res.

5:37-54. Thus, it is likely that signal transduction pathways activated by KDR/FLK-1 include the ras pathway (Rozakis *et al.*, 1992, Nature, 360:689-692), the PI-3'-kinase, the src-mediated and the plc γ -mediated pathways. Each of these pathways may play a critical role in the angiogenic and/or vasculogenic effect of KDR/FLK-1 in endothelial cells. Consequently, a still further aspect of this invention relates to the use of the organic compounds described herein to modulate angiogenesis and vasculogenesis as such processes are controlled by these pathways.

Conversely, disorders related to the shrinkage, contraction or closing of blood vessels, such as restenosis, are also implicated and may be treated or prevented by the methods of this invention.

Fibrotic disorders refer to the abnormal formation of extracellular matrices. Examples of fibrotic disorders include hepatic cirrhosis and mesangial cell proliferative disorders. Hepatic cirrhosis is characterized by the increase in extracellular matrix constituents resulting in the formation of a hepatic scar. An increased extracellular matrix resulting in a hepatic scar can also be caused by a viral infection such as hepatitis. Lipocytes appear to play a major role in hepatic cirrhosis. Other fibrotic disorders implicated include atherosclerosis.

Mesangial cell proliferative disorders refer to disorders brought about by abnormal proliferation of mesangial cells. Mesangial proliferative disorders include various human renal diseases such as glomerulonephritis, diabetic nephropathy and malignant nephrosclerosis as well as such disorders as thrombotic microangiopathy syndromes, transplant rejection, and glomerulopathies. The RTK PDGFR has been implicated in the maintenance of mesangial cell proliferation. Floege *et al.*, 1993, Kidney International 43:47S-54S.

Many cancers are cell proliferative disorders and, as noted previously, PKs have been associated with cell proliferative disorders. Thus, it is not surprising that PKs such as, for example, members of the RTK family have been associated with the development of cancer.

Some of these receptors, like 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) and PDGF-R (Kumabe *et al.*, 1992, Oncogene, 7:627-633) are over-expressed in many tumors and/or persistently activated by autocrine loops. In fact, in the most common and severe cancers these receptor over-expressions (Akbasak and 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) and autocrine loops (Lee and Donoghue, 1992, J. Cell. Biol., 118:1057-1070, Korc *et al.*, *supra*, Akbasak and Suner-Akbasak *et al.*, *supra*) have been demonstrated. For example, EGFR has been associated with squamous cell carcinoma, astrocytoma, glioblastoma, head and neck cancer, lung cancer and bladder cancer. HER2 has been associated with breast, ovarian, gastric, lung, pancreas and bladder cancer. PDGFR has

5X

been associated with glioblastoma and melanoma as well as lung, ovarian and prostate cancer. The RTK c-met has also been associated with malignant tumor formation. For example, c-met has been associated with, among other cancers, colorectal, thyroid, pancreatic, gastric and hepatocellular carcinomas and lymphomas. Additionally c-met has been linked to leukemia.

5 Over-expression of the c-met gene has also been detected in patients with Hodgkins disease and Burkitts disease.

IGF-IR, in addition to being implicated in nutritional support and in type-II diabetes, has also been associated with several types of cancers. For example, IGF-I has been implicated as an autocrine growth stimulator for several tumor types, e.g. human breast cancer carcinoma cells

10 (Arteaga *et al.*, 1989, J. Clin. Invest. 84:1418-1423) and small lung tumor cells (Macauley *et al.*, 1990, Cancer Res., 50:2511-2517). In addition, IGF-I, while integrally involved in the normal growth and differentiation of the nervous system, also appears to be an autocrine stimulator of human gliomas. Sandberg-Nordqvist *et al.*, 1993, Cancer Res. 53:2475-2478. The importance of IGF-IR and its ligands in cell proliferation is further supported by the fact that many cell types in

15 culture (fibroblasts, epithelial cells, smooth muscle cells, T-lymphocytes, myeloid cells, chondrocytes and osteoblasts (the stem cells of the bone marrow)) are stimulated to grow by IGF-I. Goldring and Goldring, 1991, Eukaryotic Gene Expression, 1:301-326. Baserga and Coppola suggest that IGF-IR plays a central role in the mechanism of transformation and, as such, could be a preferred target for therapeutic interventions for a broad spectrum of human malignancies.

20 Baserga, 1995, Cancer Res., 55:249-252, Baserga, 1994, Cell 79:927-930, Coppola *et al.*, 1994, Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595.

STKs have been implicated in many types of cancer including, notably, breast cancer (Cance, *et al.*, Int. J. Cancer, 54:571-77 (1993)).

The association between abnormal PK activity and disease is not restricted to cancer.

25 For example, RTKs have been associated with diseases such as psoriasis, diabetes mellitus, endometriosis, angiogenesis, atheromatous plaque development, Alzheimer's disease, restenosis, von Hippel-Lindau disease, epidermal hyperproliferation, neurodegenerative diseases, age-related macular degeneration and hemangiomas. For example, EGFR has been indicated in corneal and dermal wound healing. Defects in Insulin-R and IGF-IR are indicated

30 in type-II diabetes mellitus. A more complete correlation between specific RTKs and their therapeutic indications is set forth in Plowman *et al.*, 1994, DN&P 7:334-339.

As noted previously, not only RTKs but CTKs including, but not limited to, src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr and yrk (reviewed by Bolen *et al.*, 1992, FASEB J., 6:3403-3409) are involved in the proliferative and metabolic signal transduction pathway and thus could be

35 expected, and have been shown, to be involved in many PTK-mediated disorders to which the

present invention is directed. For example, mutated src (v-src) has been shown to be an oncoprotein (pp60^{v-src}) in chicken. Moreover, its cellular homolog, the proto-oncogene pp60^{c-src} transmits oncogenic signals of many receptors. Over-expression of EGFR or HER2/neu in tumors leads to the constitutive activation of pp60^{c-src}, which is characteristic of malignant cells but
5 absent in normal cells. On the other hand, mice deficient in the expression of c-src exhibit an osteopetrotic phenotype, indicating a key participation of c-src in osteoclast function and a possible involvement in related disorders.

Similarly, Zap70 has been implicated in T-cell signaling which may relate to autoimmune disorders.

10 STKs have been associated with inflammation, autoimmune disease, immunoresponses, and hyperproliferation disorders such as restenosis, fibrosis, psoriasis, osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

PKs have also been implicated in embryo implantation. Thus, the compounds of this invention may provide an effective method of preventing such embryo implantation and
15 thereby be useful as birth control agents. Additional disorders which may be treated or prevented using the compounds of this invention are immunological disorders such as autoimmune disease, AIDS and cardiovascular disorders such as atherosclerosis.

Finally, both RTKs and CTKs are currently suspected as being involved in hyperimmune disorders.

20 Examples of the effect of a number of exemplary compounds of this invention on several PTKs are shown in Table 2 below. The compounds and data presented are not to be construed as limiting the scope of this invention in any manner whatsoever.

B. Cyclooxygenase-2 inhibitor or COX-2 inhibitor or cyclooxygenase-2 inhibitor includes agents that specifically inhibit a class of enzymes, cyclooxygenase-2, with less significant
25 inhibition of cyclooxygenase-1. Preferably, it includes compounds which have a cyclooxygenase-2 IC₅₀ of less than about 0.2 μ M, and also have a selectivity ratio of cyclooxygenase-2 inhibition over cyclooxygenase-1 inhibition of at least 50, and more preferably of at least 100. Even more preferably, the compounds have a cyclooxygenase-1 IC₅₀ of greater than about 1 μ M, and more preferably of greater than 10 μ M.

30 Studies indicate that prostaglandins synthesized by cyclooxygenases play a critical role in the initiation and promotion of cancer. Moreover, COX-2 is overexpressed in neoplastic lesions of the colon, breast, lung, prostate, esophagus, pancreas, intestine, cervix, ovaries, urinary bladder, and head & neck. In several in vitro and animal models, COX-2 inhibitors have inhibited tumor growth and metastasis.

58

In addition to cancers *per se*, COX-2 is also expressed in the angiogenic vasculature within and adjacent to hyperplastic and neoplastic lesions indicating that COX-2 plays a role in angiogenesis. In both the mouse and rat, COX-2 inhibitors markedly inhibited bFGF-induced neovascularization. The utility of COX-2 inhibitors as chemopreventive, antiangiogenic and chemotherapeutic agents is described in the literature (Koki et al., Potential utility of COX-2 inhibitors in chemoprevention and chemotherapy. *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1999) 8(10) pp. 1623-1638, hereby incorporated by reference). Amplification and/or overexpression of HER-2/neu (ErbB2) occurs in 20-30% of human breast and ovarian cancers as well as in 5-15% of gastric and esophageal cancers and is associated with poor prognosis. Additionally, it has been recently discovered in vitro that COX-2 expression is upregulated in cells overexpressing the HER-2/neu oncogene. (Subbaramaiah et al., Increased expression of cyclooxygenase-2 in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. *Cancer Research* (submitted 1999), hereby incorporated by reference). In this study, markedly increased levels of PGE₂ production, COX-2 protein and mRNA were detected in HER-2/neu transformed mammary epithelial cells compared to a non-transformed partner cell line. Products of COX-2 activity, i.e., prostaglandins, stimulate proliferation, increase invasiveness of malignant cells, and enhance the production of vascular endothelial growth factor, which promotes angiogenesis. Further, HER-2/neu induces the production of angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor.

Consequently, the administration of a COX-2 inhibitor in combination with an anti HER-2/neu antibodies such as trastuzumab (Herceptin®) and other therapies directed at inhibiting HER-2/neu is contemplated to treat cancers in which HER-2/neu is overexpressed.

Also, it is contemplated that COX-2 levels are elevated in tumors with amplification and/or overexpression of other oncogenes including but not limited to *c-myc*, *N-myc*, *L-myc*, *K-ras*, *H-ras*, *N-ras*. Products of COX-2 activity stimulate cell proliferation, inhibit immune surveillance, increase invasiveness of malignant cells, and promote angiogenesis. Consequently, the administration of a protein kinase inhibitor in combination with a COX-2 inhibitor of the present invention is useful to prevent or treat cancers in which oncogenes are overexpressed.

Specific COX-2 inhibitors are useful for the treatment of cancer (WO98/16227) and in several animal models reduce angiogenesis driven by various growth factors (WO98/22101). Anti-angiogenesis was achieved with a COX-2 inhibitor in rats implanted with bFGF, vascular endothelium growth factor (VEGF) or carrageenan, proteins with well-known angiogenic

properties. (Masferrer, et al., 89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, March 1998.)

Pharmaceutical composition and Administration

5 A compound of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof, can be administered as such to a human patient or can be administered in pharmaceutical compositions in which the foregoing materials are mixed with suitable carriers or excipient(s). Techniques for formulation and administration of drugs may be found in "Remington's Pharmacological Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA., latest edition.

10 As used herein, "administer" or "administration" refers to the delivery of a compound of Formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof or of a pharmaceutical composition containing a compound of Formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof of this invention to an organism for the purpose of prevention or treatment of a PK-related disorder.

15 Suitable routes of administration may include, without limitation, oral, rectal, topical, transmucosal or intestinal administration or intramuscular, subcutaneous, intramedullary, intrathecal, direct intraventricular, intravenous, intravitreal, intraperitoneal, intranasal, or intraocular injections. The preferred routes of administration are oral and parenteral.

20 Alternatively, one may administer the compound in a local rather than systemic manner, for example, via injection of the compound directly into a solid tumor, often in a depot or sustained release formulation.

 Furthermore, one may administer the drug in a targeted drug delivery system, for example, in a liposome coated with tumor-specific antibody. The liposomes will be targeted to and taken up selectively by the tumor.

25 Pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured by processes well known in the art, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes.

30 Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention may be formulated in conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen.

ga

For injection, the compounds of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. For transmucosal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

For oral administration, the compounds can be formulated by combining the active compounds with pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. Such carriers enable the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, lozenges, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for oral ingestion by a patient.

Pharmaceutical preparations for oral use can be made using a solid excipient, optionally grinding the resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding other suitable auxiliaries if desired, to obtain tablets or dragee cores. Useful excipients are, in particular, fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol, cellulose preparations such as, for example, maize starch, wheat starch, rice starch and potato starch and other materials such as gelatin, gum tragacanth, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium carboxymethylcellulose, and/or polyvinyl- pyrrolidone (PVP). If desired, disintegrating agents may be added, such as cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, or alginic acid. A salt such as sodium alginate may also be used.

Dragee cores are provided with suitable coatings. For this purpose, concentrated sugar solutions may be used which may optionally contain gum arabic, talc, polyvinyl pyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or dragee coatings for identification or to characterize different combinations of active compound doses.

Pharmaceutical compositions which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a plasticizer, such as glycerol or sorbitol. The push-fit capsules can contain the active ingredients in admixture with a filler such as lactose, a binder such as starch, and/or a lubricant such as talc or magnesium stearate and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid paraffin, or liquid polyethylene glycols. Stabilizers may be added in these formulations, also.

The capsules may be packaged into brown glass or plastic bottles to protect the active compound from light. The containers containing the active compound capsule formulation must be stored at controlled room temperature (15-30°C).

For administration by inhalation, the compounds for use according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray using a pressurized pack or a nebulizer and a suitable propellant, e.g., without limitation, dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetra- fluoroethane or carbon dioxide. In the case of a
5 pressurized aerosol, the dosage unit may be controlled by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, for example, gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

The compounds may also be formulated for parenteral administration, e.g., by bolus
10 injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulating materials such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents.

15 Pharmaceutical compositions for parenteral administration include aqueous solutions of a water soluble form, such as, without limitation, a salt, of the active compound. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared in a lipophilic vehicle. Suitable lipophilic vehicles include fatty oils such as sesame oil, synthetic fatty acid esters such as ethyl oleate and triglycerides, or materials such as liposomes. Aqueous injection suspensions may
20 contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers and/or agents that increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a
25 suitable vehicle, e.g., sterile, pyrogen-free water, before use.

The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas, using, e.g., conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be
30 formulated as depot preparations. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example, subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. A compound of this invention may be formulated for this route of administration with suitable polymeric or hydrophobic materials (for instance, in an emulsion with a pharmaceutically acceptable oil), with ion exchange resins, or as a sparingly soluble derivative such as, without
35 limitation, a sparingly soluble salt.

60

A non-limiting example of a pharmaceutical carrier for the hydrophobic compounds of the invention is a cosolvent system comprising benzyl alcohol, a nonpolar surfactant, a water-miscible organic polymer and an aqueous phase such as the VPD co-solvent system. VPD is a solution of 3% w/v benzyl alcohol, 8% w/v of the nonpolar surfactant Polysorbate 80, and 65% w/v polyethylene glycol 300, made up to volume in absolute ethanol. The VPD co-solvent system (VPD:DSW) consists of VPD diluted 1:1 with a 5% dextrose in water solution. This co-solvent system dissolves hydrophobic compounds well, and itself produces low toxicity upon systemic administration. Naturally, the proportions of such a co-solvent system may be varied considerably without destroying its solubility and toxicity characteristics. Furthermore, the identity of the co-solvent components may be varied: for example, other low-toxicity nonpolar surfactants may be used instead of Polysorbate 80, the fraction size of polyethylene glycol may be varied, other biocompatible polymers may replace polyethylene glycol, e.g., polyvinyl pyrrolidone, and other sugars or polysaccharides may substitute for dextrose.

Alternatively, other delivery systems for hydrophobic pharmaceutical compounds may be employed. Liposomes and emulsions are well known examples of delivery vehicles or carriers for hydrophobic drugs. In addition, certain organic solvents such as dimethylsulfoxide also may be employed, although often at the cost of greater toxicity.

Additionally, the compounds may be delivered using a sustained-release system, such as semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the therapeutic agent. Various sustained-release materials have been established and are well known by those skilled in the art. Sustained-release capsules may, depending on their chemical nature, release the compounds for a few weeks up to over 100 days. Depending on the chemical nature and the biological stability of the therapeutic reagent, additional strategies for protein stabilization may be employed.

The pharmaceutical compositions herein also may comprise suitable solid or gel phase carriers or excipients. Examples of such carriers or excipients include, but are not limited to, calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars, starches, cellulose derivatives, gelatin, and polymers such as polyethylene glycols.

Many of the PK modulating compounds of the invention may be provided as physiologically acceptable salts wherein the claimed compound may form the negatively or the positively charged species. Examples of salts in which the compound forms the positively charged moiety include, without limitation, quaternary ammonium (defined elsewhere herein), salts such as the hydrochloride, sulfate, carbonate, lactate, tartrate, malate, maleate, succinate wherein the nitrogen atom of the quaternary ammonium group is a nitrogen of the selected compound of this invention which has reacted with the appropriate acid. Salts in which a

compound of this invention forms the negatively charged species include, without limitation, the sodium, potassium, calcium and magnesium salts formed by the reaction of a carboxylic acid group in the compound with an appropriate base (e.g. sodium hydroxide (NaOH), potassium hydroxide (KOH), Calcium hydroxide (Ca(OH)₂), etc.).

5 Pharmaceutical compositions suitable for use in the present invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an amount sufficient to achieve the intended purpose, e.g., the modulation of PK activity or the treatment or prevention of a PK-related disorder.

10 More specifically, a therapeutically effective amount means an amount of compound effective to prevent, alleviate or ameliorate symptoms of disease or prolong the survival of the subject being treated.

Determination of a therapeutically effective amount is well within the capability of those skilled in the art, especially in light of the detailed disclosure provided herein.

15 For any compound used in the methods of the invention, the therapeutically effective amount or dose can be estimated initially from cell culture assays. Then, the dosage can be formulated for use in animal models so as to achieve a circulating concentration range that includes the IC₅₀ as determined in cell culture (i.e., the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of the PK activity). Such information can then be used to more accurately determine useful doses in humans.

20 Toxicity and therapeutic efficacy of the compounds described herein can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., by determining the IC₅₀ and the LD₅₀ (both of which are discussed elsewhere herein) for a subject compound. The data obtained from these cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage may vary depending upon the
25 dosage form employed and the route of administration utilized. The exact formulation, route of administration and dosage can be chosen by the individual physician in view of the patient's condition. (See e.g., Fingl, *et al.*, 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

30 Dosage amount and interval may be adjusted individually to provide plasma levels of the active species which are sufficient to maintain the kinase modulating effects. These plasma levels are referred to as minimal effective concentrations (MECs). The MEC will vary for each compound but can be estimated from *in vitro* data, e.g., the concentration necessary to achieve 50-90% inhibition of a kinase may be ascertained using the assays described herein. Dosages necessary to achieve the MEC will depend on individual characteristics and route of
35 administration. HPLC assays or bioassays can be used to determine plasma concentrations.

62

Dosage intervals can also be determined using MEC value. Compounds should be administered using a regimen that maintains plasma levels above the MEC for 10-90% of the time, preferably between 30-90% and most preferably between 50-90%.

At present, the therapeutically effective amounts of compounds of Formula (I) may range from approximately 0.25 mg/m² to 1500 mg/m² per day; preferably about 3 mg/m²/day. Even more preferably 50mg/qm qd till 400 mg/qd.

Therapeutically effective amounts of cyclooxygenase inhibitor is from about 0.1 mg to about 10,000 mg for the treatment of the above conditions, with preferred levels of about 1.0 mg to about 1,000 mg.

The amount of active ingredient that may be combined with other anticancer agents to produce a single dosage form will vary depending upon the host treated and the particular mode of administration.

In cases of local administration or selective uptake, the effective local concentration of the drug may not be related to plasma concentration and other procedures known in the art may be employed to determine the correct dosage amount and interval.

The amount of a composition administered will, of course, be dependent on the subject being treated, the severity of the affliction, the manner of administration, the judgment of the prescribing physician, etc.

The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device, such as an FDA approved kit, which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient. The pack may for example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration. The pack or dispenser may also be accompanied by a notice associated with the container in a form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals, which notice is reflective of approval by the agency of the form of the compositions or of human or veterinary administration. Such notice, for example, may be of the labeling approved by the U.S. Food and Drug Administration for prescription drugs or of an approved product insert. Compositions comprising a compound of the invention formulated in a compatible pharmaceutical carrier may also be prepared, placed in an appropriate container, and labeled for treatment of an indicated condition. Suitable conditions indicated on the label may include treatment of a tumor, inhibition of angiogenesis, treatment of fibrosis, diabetes, and the like.

It is also an aspect of this invention that a compound described herein, or its salt or prodrug, might be combined with other chemotherapeutic agents for the treatment of the diseases and disorders discussed above. For instance, a compound, salt or prodrug of this

invention might be combined with alkylating agents such as fluorouracil (5-FU) alone or in further combination with leukovorin; or other alkylating agents such as, without limitation, other pyrimidine analogs such as UFT, capecitabine, gemcitabine and cytarabine, the alkyl sulfonates, e.g., busulfan (used in the treatment of chronic granulocytic leukemia), improsulfan and piposulfan; aziridines, e.g., benzodepa, carboquone, meturedopa and uredepa; ethyleneimines and methylmelamines, e.g., altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramidate and trimethylolmelamine; and the nitrogen mustards, e.g., chlorambucil (used in the treatment of chronic lymphocytic leukemia, primary macroglobulinemia and non-Hodgkin's lymphoma), cyclophosphamide (used in the treatment of Hodgkin's disease, multiple myeloma, neuroblastoma, breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, Wilm's tumor and rhabdomyosarcoma), estramustine, ifosfamide, novembrichin, prednimustine and uracil mustard (used in the treatment of primary thrombocytosis, non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and ovarian cancer); and triazines, e.g., dacarbazine (used in the treatment of soft tissue sarcoma).

A compound, salt or prodrug of this invention can also be used in combination with other antimetabolite chemotherapeutic agents such as, without limitation, folic acid analogs, e.g. methotrexate (used in the treatment of acute lymphocytic leukemia, choriocarcinoma, mycosis fungoides breast cancer, head and neck cancer and osteogenic sarcoma) and pteropterin; and the purine analogs such as mercaptopurine and thioguanine which find use in the treatment of acute granulocytic, acute lymphocytic and chronic granulocytic leukemias.

It is contemplated that a compound, salt or prodrug of this invention can also be used in combination with natural product based chemotherapeutic agents such as, without limitation, the vinca alkaloids, e.g., vinblastin (used in the treatment of breast and testicular cancer), vincristine and vindesine; the epipodophylotoxins, e.g., etoposide and teniposide, both of which are useful in the treatment of testicular cancer and Kaposi's sarcoma; the antibiotic chemotherapeutic agents, e.g., daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, mitomycin (used to treat stomach, cervix, colon, breast, bladder and pancreatic cancer), dactinomycin, temozolomide, plicamycin, bleomycin (used in the treatment of skin, esophagus and genitourinary tract cancer); and the enzymatic chemotherapeutic agents such as L-asparaginase.

In addition to the above, a compound, salt or prodrug of this invention could also be used in combination with the platinum coordination complexes (cisplatin, etc.); substituted ureas such as hydroxyurea; methylhydrazine derivatives, e.g., procarbazine; adrenocortical suppressants, e.g., mitotane, aminoglutethimide; and hormone and hormone antagonists such as the adrenocorticosteroids (e.g., prednisone), progestins (e.g., hydroxyprogesterone

caproate); estrogens (e.g., diethylstilbesterol); antiestrogens such as tamoxifen; androgens, e.g., testosterone propionate; and aromatase inhibitors such as anastrozole.

Other antineoplastic agents known in the art can be used along with the combination therapy of the present invention. Examples of these antineoplastic agents and other are give in Applicants'

5 United States patent application Serial No. 60/113,786, filed December 23, 1998, and PCT Application Publication No. WO 00/38716 the disclosure of which is incorporated herein by reference.

Finally, it is also contemplated that the combination of a compound of this invention will be effective in combination with mitoxantrone or paclitaxel for the treatment of solid
10 tumor cancers or leukemias such as, without limitation, acute myelogenous (non-lymphocytic) leukemia.

EXAMPLES

Synthetic Examples

The following preparations and examples are given to enable those skilled in the art to
15 more clearly understand and to practice the present invention. They should not be considered as limiting the scope of the invention, but merely as being illustrative and representative thereof.

**SYNTHESIS OF PROTEIN KINASE INHIBITOR OF THE PRESENT INVENTION-
COMPOUNDS OF FORMULA (I)**

General Synthetic Procedure:

5 The following general methodology may be employed to prepare the compounds of this invention:

 The appropriately substituted 2-oxindole (1 equiv.), the appropriately substituted aldehyde (1.2 equiv.) and a base (0.1 equiv.) are mixed in a solvent (1-2 ml/mmol 2-oxindole) and the mixture is then heated for from about 2 to about 12 hours. After cooling, the
10 precipitate that forms is filtered, washed with cold ethanol or ether and vacuum dried to give the solid product. If no precipitate forms, the reaction mixture is concentrated and the residue is triturated with dichloromethane/ether, the resulting solid is collected by filtration and then dried. The product may optionally be further purified by chromatography.

 The base may be an organic or an inorganic base. If an organic base is used, preferably
15 it is a nitrogen base. Examples of organic nitrogen bases include, but are not limited to, diisopropylamine, trimethylamine, triethylamine, aniline, pyridine, 1,8-diazabicyclo[5.4.1]undec-7-ene, pyrrolidine and piperidine.

 Examples of inorganic bases are, without limitation, ammonia, alkali metal or alkaline earth hydroxides, phosphates, carbonates, bicarbonates, bisulfates and amides. The alkali metals
20 include, lithium, sodium and potassium while the alkaline earths include calcium, magnesium and barium.

 In a presently preferred embodiment of this invention, when the solvent is a protic solvent, such as water or alcohol, the base is an alkali metal or an alkaline earth inorganic base, preferably, a alkali metal or an alkaline earth hydroxide.

25 It will be clear to those skilled in the art, based both on known general principles of organic synthesis and on the disclosures herein which base would be most appropriate for the reaction contemplated.

 The solvent in which the reaction is carried out may be a protic or an aprotic solvent, preferably it is a protic solvent. A "protic solvent" is a solvent which has hydrogen atom(s)
30 covalently bonded to oxygen or nitrogen atoms which renders the hydrogen atoms appreciably acidic and thus capable of being "shared" with a solute through hydrogen bonding. Examples of protic solvents include, without limitation, water and alcohols.

 An "aprotic solvent" may be polar or non-polar but, in either case, does not contain acidic hydrogens and therefore is not capable of hydrogen bonding with solutes. Examples, without
35 limitation, of non-polar aprotic solvents, are pentane, hexane, benzene, toluene, methylene

69

chloride and carbon tetrachloride. Examples of polar aprotic solvents are chloroform, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxide and dimethylformamide.

In a presently preferred embodiment of this invention, the solvent is a protic solvent, preferably water or an alcohol such as ethanol.

5 The reaction is carried out at temperatures greater than room temperature. The temperature is generally from about 30° C to about 150° C, preferably about 80° C to about 100° C, most preferable about 75° C to about 85° C, which is about the boiling point of ethanol. By "about" is meant that the temperature range is preferably within 10 degrees Celcius of the indicated temperature, more preferably within 5 degrees Celcius of the indicated temperature and, most
10 preferably, within 2 degrees Celcius of the indicated temperature. Thus, for example, by "about 75° C" is meant $75^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, preferably $75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ and most preferably, $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2-Oxindoles and aldehydes, may be readily synthesized using techniques well known in the chemical arts. It will be appreciated by those skilled in the art that other synthetic pathways for forming the compounds of the invention are available and that the following is offered by
15 way of example and not limitation.

Method A: Formylation of pyrroles

POCl_3 (1.1 equiv.) is added dropwise to dimethylformamide (3 equiv.) at -10°C followed by addition of the appropriate pyrrole dissolved in dimethylformamide. After stirring
20 for two hours, the reaction mixture is diluted with H_2O and basified to pH 11 with 10 N KOH. The precipitate which forms is collected by filtration, washed with H_2O and dried in a vacuum oven to give the desired aldehyde.

Method B: Saponification of pyrrolecarboxylic acid esters

A mixture of a pyrrolecarboxylic acid ester and KOH (2 – 4 equiv.) in EtOH is refluxed
25 until reaction completion is indicated by thin layer chromatography (TLC). The cooled reaction mixture is acidified to pH 3 with 1 N HCl. The precipitate which forms is collected by filtration, washed with H_2O and dried in a vacuum oven to give the desired pyrrolecarboxylic acid.

Method C: Amidation

30 To a stirred solution of a pyrrolecarboxylic acid dissolved in dimethylformamide (0.3M), is added 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide (1.2 equiv.), 1-hydroxybenzotriazole (1.2 equiv.), and triethylamine (2 equiv.). The appropriate amine is added (1 equiv.) and the reaction stirred until completion is indicated by TLC. Ethyl acetate is then added to the reaction mixture and the solution washed with saturated NaHCO_3 and brine

(with extra salt), dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated to afford the desired amide.

Method D: Condensation of aldehydes and oxindoles containing carboxylic acid substituents

5 A mixture of the oxindole (1 equivalent), 1 equivalent of the aldehyde and 1 – 3 equivalents of piperidine (or pyrrolidine) in ethanol (0.4 M) is stirred at 90-100° C until reaction completion is indicated by TLC. The mixture is then concentrated and the residue acidified with 2N HCl. The precipitate that forms is washed with H_2O and EtOH and then dried in a vacuum oven to give the product.

10 **Method E: Condensation of aldehydes and oxindoles not containing carboxylic acid substituents**

A mixture of the oxindole (1 equivalent), 1 equivalent of the aldehyde and 1 – 3 equivalents of piperidine (or pyrrolidine) in ethanol (0.4 M) is stirred at 90-100° C until reaction completion is indicated by TLC. The mixture is cooled to room temperature and the solid which forms is collected by vacuum filtration, washed with ethanol and dried to give the product. If a precipitate does not form upon cooling of the reaction mixture, the mixture is concentrated and purified by column chromatography.

C. Examples of oxindole syntheses

The following examples of the synthesis of representative oxindoles is not to be construed as limiting the scope of this invention in any manner whatsoever. Alternate routes to the oxindoles shown as well as other oxindoles to be used to make the compounds of this invention will become apparent to those skilled in the art based on the following disclosures. Such syntheses and oxindoles are within the scope and spirit of this invention.

5-Amino-2-oxindole

25 5-Nitro-2-oxindole (6.3 g) was hydrogenated in methanol over 10% palladium on carbon to give 3.0 g (60% yield) of the title compound as a white solid.

5-Bromo-2-oxindole

2-Oxindole (1.3 g) in 20 mL acetonitrile was cooled to -10 °C and 2.0 g N-bromosuccinimide was slowly added with stirring. The reaction was stirred for 1 hour at -10 °C and 2 hours at 0 °C. The precipitate was collected, washed with water and dried to give 1.9 g (90 % yield) of the title compound.

4-Methyl-2-oxindole

35 Diethyl oxalate (30 mL) in 20 mL of dry ether was added with stirring to 19 g of potassium ethoxide suspended in 50 mL of dry ether. The mixture was cooled in an ice bath and 20 mL of 3-nitro-o-xylene in 20 mL of dry ether was slowly added. The thick dark red mixture was heated to reflux for 0.5 hr, concentrated to a dark red solid, and treated with 10%

64

sodium hydroxide until almost all of the solid dissolved. The dark red mixture was treated with 30% hydrogen peroxide until the red color changed to yellow. The mixture was treated alternately with 10% sodium hydroxide and 30% hydrogen peroxide until the dark red color was no longer present. The solid was filtered off and the filtrate acidified with 6N hydrochloric acid. The resulting precipitate was collected by vacuum filtration, washed with water, and dried under vacuum to give 9.8 g (45% yield) of 2-methyl-6-nitrophenylacetic acid as an off-white solid. The solid was hydrogenated in methanol over 10 % palladium on carbon to give 9.04 g of the title compound as a white solid.

7-Bromo-5-chloro-2-oxindole

5-Chloro-2-oxindole (16.8 g) and 19.6 g of N-bromosuccinimide were suspended in 140 mL of acetonitrile and refluxed for 3 hours. Thin layer chromatography (silica, ethyl acetate) at 2 hours of reflux showed 5-chloro-2-oxindole or N-bromosuccinimide (Rf 0.8), product (Rf 0.85) and a second product (Rf 0.9) whose proportions did not change after another hour of reflux. The mixture was cooled to 10 °C, the precipitate was collected by vacuum filtration, washed with 25 mL of ethanol and sucked dry for 20 minutes in the funnel to give 14.1 g of wet product (56 % yield). The solid was suspended in 200 mL of denatured ethanol and slurry-washed by stirring and refluxing for 10 minutes. The mixture was cooled in an ice bath to 10 °C. The solid product was collected by vacuum filtration, washed with 25 mL of ethanol and dried under vacuum at 40 °C to give 12.7 g (51% yield) of 7-bromo-5-chloro-2-oxindole.

5-Fluoro-2-oxindole

5-Fluoroisatin (8.2 g) was dissolved in 50 mL of hydrazine hydrate and refluxed for 1.0 hr. The reaction mixtures were then poured in ice water. The precipitate was then filtered, washed with water and dried in a vacuum oven to afford the title compound.

5-Nitro-2-oxindole

2-Oxindole (6.5 g) was dissolved in 25 mL concentrated sulfuric acid and the mixture maintained at -10 to -15 °C while 2.1 mL of fuming nitric acid was added dropwise. After the addition of the nitric acid the reaction mixture was stirred at 0 °C for 0.5 hr and poured into ice-water. The precipitate was collected by filtration, washed with water and crystallized from 50% acetic acid. The crystalline product was then filtered, washed with water and dried under vacuum to give 6.3 g (70%) of 5-nitro-2-oxindole.

5-Aminosulfonyl-2-oxindole

To a 100 mL flask charged with 27 mL of chlorosulfonic acid was added slowly 13.3 g of 2-oxindole. The reaction temperature was maintained below 30 °C during the addition.

After the addition, the reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 hr, heated to 68 °C for 1 hr, cooled, and poured into water. The precipitate was washed with water and dried in a vacuum oven to give 11.0 g of 5-chlorosulfonyl-2-oxindole (50% yield) which was used without further purification.

- 5 5-Chlorosulfonyl-2-oxindole (2.1 g) was added to 10 mL of ammonium hydroxide in 10 mL of ethanol and stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated and the solid collected by vacuum filtration to give 0.4 g (20% yield) of the title compound as an off-white solid.

5-Isopropylaminosulfonyl-2-oxindole

- 10 To a 100 mL flask charged with 27 mL chlorosulfonic acid was slowly added 13.3 g 2-oxindole. The reaction temperature was maintained below 30° C during the addition. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 hour, heated to 68° C for 1 hour, cooled, and poured into water. The precipitate which formed was filtered, washed with water and dried in a vacuum oven to give 11.0 g (50%) of 5-chlorosulfonyl-2-oxindole which was
15 used without further purification.

- A suspension of 3 g 5-chlorosulfonyl-2-oxindole, 1.15 g isopropylamine and 1.2 mL of pyridine in 50 mL of dichloromethane was stirred at room temperature for 4 hours during which time a white solid formed. The solid was collected by vacuum filtration, slurry-washed with hot ethanol, cooled, collected by vacuum filtration and dried under vacuum at 40° C
20 overnight to give 1.5 g (45%) of 5-isopropylaminosulfonyl-2-oxindole.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.69 (s, br, 1H, NH), 7.63 (dd, *J* = 2 and 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-Phenylaminosulfonyl-2-oxindole

- 25 A suspension of 5-chlorosulfonyl-2-oxindole (1.62 g, 7 mmol), aniline (0.782 mL, 8.4 mmol) and pyridine (1 mL) in dichloromethane (20 ml) was stirred at room temperature for 4 hours. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (300 mL) and acidified with 1N hydrochloric acid (16 mL). The organic layer was washed with sodium bicarbonate and brine, dried and concentrated. The residue was washed with ethanol (3 mL) and then
30 chromatographed on silica gel eluting with methanol/ dichloromethane 1:9 to give of 5-phenylaminosulfonyl-2-oxindole.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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).

65

2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid pyridin-3-ylamide

A solution of 5-chlorosulfonyl-2-oxindole (3 g) and 3-aminopyridine (1.46g) in pyridine (15 mL) was stirred at room temperature overnight at which time a brown solid was present. The solid was filtered, washed with ethanol and dried under vacuum to yield 1.4 g (38%) of 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid pyridin-3-ylamide.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.74 (s, 1H, NH), 10.39 (s, 1H, SO₂NH), 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-Phenyloxindole

5-Bromo-2-oxindole (5 g, 23.5 mmol) was dissolved in 110 mL toluene and 110 mL ethanol with stirring and a little heat. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (1.9 g, 1.6 mmol) was added followed by 40 mL (80 mmol) 2M aqueous sodium carbonate. To this mixture was added benzene boronic acid (3.7 g, 30.6 mmol) and the mixture was heated in a 100° C oil bath for 12 hours. The reaction was cooled, diluted with ethyl acetate (500 mL), washed with saturated sodium bicarbonate (200 mL), water (200 mL), 1N HCl (200 mL) and brine (200 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate and concentrated to afford a brown solid. Trituration with dichloromethane afforded 3.8 g (77%) of 5-phenyl-2-oxindole as a tan solid.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.4 (br s, 1H, NH), 7.57 (dd, *J* = 1.8 and 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, CH₂CO).

MS *m/z* 209 [M⁺].

In similar fashion, the following oxindoles can be prepared:

6-(3,5-Dichlorophenyl)-1,3-dihydroindol-2-one

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-Butylphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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 and 7.8 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H, CH₂CO), 2.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.57 (m, 2H, CH₂), 1.32 (m, 2H, CH₂), 0.9 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃).

6-(5-Isopropyl-2-methoxyphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, OCH₃), 3.47 (s, 2H, CH₂CO), 2.86 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.19 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

5 MS-EI *m/z* 281 [M]⁺.

6-(4-Ethylphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, CH₂CO), 2.63 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.20 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₂CH₃).

10

MS-EI *m/z* 237 [M]⁺.

6-(3-Isopropylphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, CH₂CO), 2.95 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

15

MS-EI *m/z* 251 [M]⁺.

6-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.45 (s, 2H, CH₂CO).

20

MS-EI *m/z* 269 [M]⁺.

6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-one

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.51 (s, 1H, NH), 8.81 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.55 (dd, *J* = 1.8 and 5.7 Hz, 1H), 8 (m, 1H), 7.45 (dd, *J* = 5.7 and 9.3 Hz, 1H), 7.3 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 3.51 (s, 2H, CH₂CO).

25

MS *m/z* 210 [M]⁺.

2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-4-carboxylic acid (3-chloro-4-ethoxyphenyl)-amide

To a solution of 4-carboxy-2-oxindole (200 mg, 1.13 mmol) and 3-chloro-4-methoxyphenylamine (178 mg, 1.13 mmol) in dimethylformamide (15 mL) at room temperature was added benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent, 997 mg, 2.26 mmol) followed by 4-dimethylaminopyridine (206 mg, 1.69 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 72 hours. The reaction was then diluted with ethyl acetate (300 mL), washed with saturated sodium bicarbonate (100 mL), water, 2N hydrochloric acid (100 mL), water (3x200 mL) and

30

86

brine. It was then dried over magnesium sulfate and concentrated. The residue was triturated with ethyl acetate to give 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-4-carboxylic acid (3-chloro-4-methoxyphenyl)-amide as a pink solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, OCH₃), 3.69 (s, 2H, CH₂).

MS-EI *m/z* 316 [M]⁺.

4-Carboxy-2-oxindole

A solution of trimethylsilyldiazomethane in hexane (2 M) was added dropwise to a solution of 2.01 g 2-chloro-3-carboxy-nitrobenzene in 20 mL methanol at room temperature until no further gas evolution occurred. Acetic acid was then added to quench excess trimethylsilyldiazomethane. The reaction mixture was evaporated under vacuum and the residue was dried in an oven overnight. The 2-chloro-3-methoxycarbonylnitrobenzene obtained was pure enough for the following reaction.

Dimethyl malonate (6.0 mL) was added to an ice-cold suspension of 2.1 g sodium hydride in 15 mL DMSO. The reaction mixture was stirred at 100° C for 1 hour and then cooled to room temperature. 2-Chloro-3-methoxycarbonylnitrobenzene (2.15 g) was added in one portion and the mixture was heated to 100° C for 1.5 hours. The reaction mixture was then cooled to room temperature, poured into ice water, acidified to pH 5 and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give 3.0 g of the dimethyl 2-methoxycarbonyl-6-nitrophenyl- malonate.

Dimethyl 2-methoxycarbonyl-6-nitrophenylmalonate (3.0 g) was refluxed in 50 mL of 6 N hydrochloric acid overnight. The mixture was concentrated to dryness, 20 mL ethanol and 1.1 g of tin(II) chloride were added and the mixture was refluxed for 2 hours. The mixture was filtered through Celite, concentrated and chromatographed on silica gel using ethyl acetate:hexane:acetic acid as eluent to give 0.65 g (37%) of 4-carboxy-2-oxindole as a white solid.

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

D. Synthesis of pyrrole substituted 2-indolinones.

Example 1

4-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid

4-Methyl-2-pyrrolecarboxylic acid ethyl ester (commercially available) was formylated using method A to give (73%) of 5-formyl-4-methyl-2-pyrrolecarboxylic acid ethyl ester. It

was then hydrolysed using method B to give 5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (58%).

5 Oxindole (133 mg, 1 mmol) was condensed with 5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (153 mg) using method D to give 268 mg (100%) of the title compound as an orange-red solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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, CH₃).

MS (negative mode) 266.8 [M-1]⁺.

10 Example 2

4-Methyl-5-(1-methyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid

1-Methyl-1,3-dihydroindol-2-one (147 mg, 1 mmol) was condensed with 5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (153 mg) using method D to give 250 mg (86%) of the title compound.

15 ¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.82 (s, br, 1H, NH), 12.88 (s, br, 1H, 7.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H, H-vinyl), 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, CH₃).

MS *m/z* 283.0 [M+1]⁺.

Example 3

20 4-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid methyl ester

Oxindole (105 mg, 0.79 mmol) was condensed with 5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid methyl ester (110 mg, 0.67 mmol) using method E to give 153.2 mg (81%) of the title compound.

25 ¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 7.2 (dt, *J* = 1.2 & 7.7 Hz, 1H), 7.01 (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].

Example 4

30 5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester

5-Chloro-1,3-dihydroindol-2-one (2.22 g, 13.2 mmol) was condensed with 5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester (2.43 g) using method E to give 4.1 g (94%) of the title compound as an orange solid.

b7X

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.95 (s, br, 1H, NH), 7.98 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.78 (s, 1H, H-vinyl), 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, OCH₂CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

5 MS-EI *m/z* 330 [M⁺].

Example 5

5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid

A mixture of 5-(5-chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester (1.3 g, 4 mmol) and potassium hydroxide in methanol (25 mL) and ethanol (25 mL) was heated to reflux for overnight. Insoluble materials were removed by filtration and the mixture was neutralized with 6N hydrochloric acid to give 0.876 g (70%) of the title compound.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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 Hz, 1H, H-3'), 2.35 (s, 3H, CH₃).

MS-EI *m/z* 302 [M⁺].

Example 6

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-yl-propyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (0.16 g, 0.76 mmol) was condensed with 5-formyl-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide (0.2 g, prepared by method C) to give 60 mg (17%) of the title compound as an orange solid.

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-vinyl), 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 and 458 [M⁺-1 and M⁺+2].

Example 7

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylamino-propyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (0.16 g, 0.75 mmol) was condensed with 5-formyl-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (0.2 g, prepared by method C) to give 30 mg (8%) of the title compound as an orange solid.

¹H NMR (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-vinyl), 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 and 460 [*M*⁺-1 and *M*⁺+2].

Example 8

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (212 mg, 1 mmol) was condensed with 5-formyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (prepared from ethyl pyrrole-2-carboxylate by method A, B and then C) to give 162 mg (38%) of the title compound.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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 and 432 [*M*⁺-1 and *M*⁺+1].

Example 9

5-(2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

6-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (209 mg, 1mmol) was condensed with 5-formyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide to give 182 mg (42%) of the title compound.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.56 (s, br, 1H, NH), 11.06 (s, br, 1H, NH), 8.36 (t, 1H, CONHCH₂), 7.77 (s, 1H, H-vinyl), 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 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 428 [*M*⁺].

Example 10

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)-methyl-amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (212 mg, 1 mmol) was condensed with 5-formyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)methylamide to give 246 mg (55%) of the title compound.

66

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, CH₂), 3.25 (s, br, 3H, NCH₃), 2.57 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 2.45 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0.91 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

5 MS-EI *m/z* 444 and 446 [*M*⁺-1 and *M*⁺+1].

Example 11

5-(2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)methylamide

10 6-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (209 mg, 1 mmol) was condensed with 5-formyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)methylamide to give 277 mg (63%) of the title compound.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.58 (s, br, 1H, NH), 11.04 (s, br, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, H-vinyl), 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, CH₂), 3.25 (s, br, 3H, NCH₃),
15 2.58 (t, 2H, CH₂), 2.44 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0.92 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Example 12

3-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide

20 Oxindole (66.5 mg, 0.5 mmol) was condensed with 5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (prepared from 3-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester by method B then C) to give 39 mg (21%) of the title compound.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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), 3.26-3.32 (m, 2H, CH₂), 2.41-2.48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.63 (m,
25 2H, CH₂), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 380 [*M*⁺].

Example 13

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylamino-propyl)amide

30 5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (106 mg, 0.5 mmol) was condensed with 5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide to give 35 mg (15%) of the title compound.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 7.74 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, CONHCH₂), 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 & $N(CH_2CH_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

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

5 **Example 14**

3-Methyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide

6-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (105 mg, 0.5 mmol) was condensed with 5-formyl-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide to give 67.8 (30%) of the
10 title compound.

^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 & $N(CH_2CH_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.64 (m, 2H, CH_2), 0.94 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

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

15 **Example 15**

5-(5-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylamino-propyl)amide

5-Methoxy-1,3-dihydroindol-2-one (82.5 mg, 0.5 mmol) was condensed with 5-formyl-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide to give 80 mg (39%) of
20 the title compound.

^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 & $N(CH_2CH_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

25 MS m/z 410 [M^+].

Example 16

5-(6-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylamino-propyl)amide

6-Methoxy-1,3-dihydroindol-2-one (82.5 mg, 0.5 mmol) was condensed with 5-formyl-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide to give 63 mg (31%) of
30 the title compound.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.22 (s, br, 1H, NH), 10.86 (s, br, 1H, NH), 7.39-7.63 and 6.37-6.55 (m, 6H), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.3 (m, 2H, CH_2), 2.45 (m, 6H, CH_2 & $N(CH_2CH_3)_2$), 2.28 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (m, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

69

MS m/z 410 [M^+].**Example 17**

3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide

5 4,5,6,7-Tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid ethyl ester (May, Donald A.; Lash, Timothy D.; *J. Org. Chem.*, 1992, 57:18, 4820-4828) was formylated using method A then B to give 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid.

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (1.43 g, 6.8 mmol) was condensed with 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (1.97 g) to give
10 2.2 g (67%) of the title compound as a yellow-orange solid.

^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, $J = 2.1$ and 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, pyrrole CH_2), 2.72 (br m, 2H, pyrrole CH_2), 1.7 (br m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.74 (br s, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$),
15 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 484 and 486 [$M^+ - 1$ and $M^+ + 1$].

Example 18

3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (3-diethylamino-propyl)amide

20 5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (20 mg, 0.1 mmol) was condensed with 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (30 mg) to give 33 mg (46%) of the title compound as an orange solid.

^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), 7.29 (d, $J = 1.9$ and 8.5 Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 2.7
25 (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 and 501 [M^+ and $M^+ + 2$].

Example 19

30 3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (80 mg, 0.4 mmol) was condensed with 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide (120 mg) to give 43 mg (22%) of the title compound as a tan-orange solid.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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 and 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, *J* = 8 Hz, 1H, ArH), 3.3 (br m, 2H, 2xNCH₂), 2.8 (m, 4H, 2xpyrroleCH₂), 2.5 (br m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1.6 (br m, 8H, 2xpyrroleCH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂ and CONHCH₂).

5 MS-EI *m/z* 497 and 499 [*M*⁺ and *M*⁺+2].

Example 20

3-(2-Oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-isoindole-1-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

10 6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-one (60 mg, 0.4 mmol) was condensed with 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-isoindole-1-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (80 mg) to give 50 mg (38%) of the title compound as a reddish solid.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, 2xpyrroleCH₂), 2.5 (br m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ and NCH₂), 1.75 (br s, 4H, 2xpyrroleCH₂CH₂), 0.9 (t, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 484 [*M*⁺].

Example 21

20 4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide

To a mixture of benzoyl chloride (1 equiv.) and aluminum chloride (1 equiv.) in dichloroethane at 0° C was added ethyl 3,5-dimethyl-2-pyrrolicarboxylate (1 equiv.). The mixture was stirred at 80° C for 4 hr. The mixture was then extracted with ethyl acetate (EtOAc) and H₂O. The combined organic extracts were washed with saturated sodium bicarbonate and brine, dried and concentrated to give (51%) of 4-benzoyl-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid.

30 A mixture of 4-benzoyl-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester (4.13 g, 15.2 mmol) and ceric ammonium nitrate (33 g, 4equiv.) in 50 mL of tetrahydrofuran (THF):acetic acid (HOAc):H₂O 1:1:1 was refluxed overnight. The reaction mixture was then cooled, extracted with EtOAc and then basified to pH 9 with sodium carbonate. The organic layer was then washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated followed by column chromatography to give 3.25 g (75%) of 4-benzoyl-5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester as a yellow solid.

35 5-Bromo-1,3-dihydro-indol-2-one was condensed with 4-benzoyl-5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid using method D to give 4-benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-

dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid.

The above carboxylic acid was then coupled with *N,N*-diethyl-1,3-propanediamine using method C to give the title compound.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 7.96 (m, 1H, CONHCH₂), 7.76 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H),
 5 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 Electron Impact *m/z* 564 [M⁺+1].

Example 22

10 4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-morpholin-4-ylpropyl)amide

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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
 15 (m, 6H, 3xCH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂).

Example 23

4-Benzoyl-3-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 7.17 (m, 1H), 6.92 (m, 1H), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.44 (m, 6H, 3xCH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.65-1.75 (m, 6H, 3xCH₂).

MS Electron Impact *m/z* 482 [M⁺].

Example 24

25 4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14.01 (s, 1H, NH), 11.18 (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, 6H, 3xCH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.64 (m, 4H, 2xCH₂).

30

Example 25**4-Benzoyl-3-methyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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 Electron Impact *m/z* 558 [M⁺].

Example 26**4-Benzoyl-5-(6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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 Electron Impact *m/z* 512 [M⁺].

Example 27**4-Benzoyl-5-(5-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide**

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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 Electron Impact *m/z* 512 [M⁺].

Example 28**4-Benzoyl-5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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 Electron Impact *m/z* 500 [M⁺].

72

Example 29**4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide**

5 5-Bromo-1,3-dihydro-indol-2-one was condensed with 4-acetyl-5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (prepared from 4-acetyl-5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester by method B then C) to give the title compound.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14.19 (s, 1H, *NH*), 11.19 (br s, 1H, *NH*), 8.15 (m, 1H, *CONHCH*₂), 8.11 (s, 1H, H-vinyl), 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, *CH*₂), 2.57 (s, 3H, *CH*₃CO), 2.46 (m, 9 H, *CH*₃ & 3x*CH*₂), 1.64 (m, 2H, *CH*₂), 0.93 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, *N*(*CH*₂*CH*₃)₂).

Example 30**4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide**

15 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.14 (m, 1H, *CONHCH*₂), 8.10 (s, 1H, H-vinyl), 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, *CH*₂), 2.57 (s, 3H, *CH*₃CO), 2.44 (s, 3H, *CH*₃), 2.35-2.48 (m, 6H, 3x*CH*₂), 1.65-1.71 (m, 6H, 3x*CH*₂).

MS *m/z* 499 & 501 [*M*⁺] & [*M*⁺+2].

Example 31**4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-morpholin-4-ylpropyl)amide**

25 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14.20 (s, 1H, *NH*), 11.26 (br s, 1H, *NH*), 8.09 (m, 2H, H-vinyl & *CONHCH*₂), 7.73 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-4), 7.38 (dd, *J* = 1.5 & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 3.55 (m, 4H, 2x*CH*₂), 3.26 (m, 2H, *CH*₂), 2.57 (s, 3H, *CH*₃CO), 2.44 (s, 3H, *CH*₃), 2.35 (m, 6H, 3x*CH*₂), 1.68 (m, 2H, *CH*₂).

MS-EI *m/z* 514 & 516 [*M*⁺-1] & [*M*⁺+1].

Example 32**4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (3-hydroxypropyl)amide**

30 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14.17 (s, 1H, *NH*), 11.25 (br s, 1H, *NH*), 8.10 (s, 1H, H-vinyl), 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 [M^+-1] & [M^++1].

Example 34

4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-morpholin-4-ylethyl)amide

- 5 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.19 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, H-vinyl), 7.84 (m, 1H, CONHCH₂), 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, 2xCH₂), 3.40 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.45 (m, CH₃ & CH₂).

MS-EI m/z 500 & 502 [M^+-1] & [M^++1].

10 **Example 35**

4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

- 15 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.17 (s, 1H, NH), 11.23 (s, 1H, NH), 8.11 (s, 1H, H-vinyl), 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).

Example 36

4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid [2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]amide

- 20 ^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].

25 **Example 37**

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide

- 30 A mixture of 2-aminoacetophenone hydrochloride (1 equiv.), ethyl isobutyrylacetate (1.2 equiv.) and sodium acetate (2.4 equiv.) in H₂O was stirred at 100°C for 18 hours and then cooled to room temperature. The aqueous layer was decanted off and the oil was dissolved in ethyl acetate. It was then washed with water and brine and then dried to give (93%) of 2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester as a red brown oil.

12

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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).

MS-EI *m/z* 257 [M⁺].

- 5 The above pyrrole was formylated using method A to give (41%) 5-formyl-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester as a reddish solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12.35 (s, br, 1H, NH), 9.14 (s, 1H, CHO), 7.36 (s, 5H), 3.96 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.74 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 0.90 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

- 10 MS-EI *m/z* 285 [M⁺].

The pyrrolecarboxylic acid ester was hydrolysed using method B to give (57%) of 5-formyl-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid as a beige solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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, CH(CH₃)₂), 1.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

- 15 MS-EI *m/z* 257 [M⁺].

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (120 mg, 0.31 mmol) was condensed with 5-formyl-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (prepared by method C) to give 120 mg (71%) of the title compound.

- 20 ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14.23 (s, br, 1H, NH), 11.08 (s, br, 1H, NH), 7.38-7.55 (m, 7H, Ar-H & CONHCH₂), 7.30 (s, 1H, H-vinyl), 7.26 (dd, *J* = 1.8 & 7.8 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.36 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.07 (m, 2H, CH₂), 2.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 2.22 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 1.40 (m, 2H, CH₂), 1.31 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 0.86 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS *m/z* 565.1 [M⁺+1].

- 25 **Example 38**

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide

- 30 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (127 mg, 0.28 mmol) was condensed with 3-pyrrolidin-1-yl-propylamine (43 mg, 0.336 mmol) to give 140 mg (66%) of the title compound..

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 and 562 [$M^+ - 1$ and $M^+ + 1$].

Example 39

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

5 5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (57 mg, 0.27 mmol) was condensed with 5-formyl-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (120 mg) to give 78 mg (53%) of the title compound as a yellow solid.

10 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) 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 and 550 [$M^+ - 1$ and $M^+ + 1$].

Example 40

15 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (53 mg, 0.25 mmol) was condensed with 5-formyl-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]amide (300 mg) to give 65 mg of the title compound.

20 ^1H NMR (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 and 591 [$M^+ - 1$ and $M^+ + 1$].

Example 41

25 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (170 mg, 0.8 mmol) was condensed with 5-formyl-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (205 mg) using method D to give 210 mg (58%) of the title compound as a yellow solid.

30 ^1H NMR (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-vinyl), 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 [$M^+ + 1$].

13

Example 42**5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide**

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (44 mg, 0.21 mmol) was condensed with 5-formyl-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (70 mg, prepared in the same manner as the isopropyl analog, above) to give 0.03 g (27%) of the title compound as a yellow solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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 and 520 [*M*⁺-1 and *M*⁺+1].

Example 43**5-[6-(2-Methoxyphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide**

6-(2-Methoxyphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (50 mg, 0.21 mmol) was condensed with 5-formyl-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (70 mg) to give 0.04 g (35%) of the title compound as a yellow-orange solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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*⁺].

Example 44**5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide**

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (46 mg, 0.22 mmol) was condensed with 5-formyl-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide (65 mg) to give 60 mg (55%) of the title compound as a yellow solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, H-vinyl), 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 and 494.8 [*M*⁺ and *M*⁺+2].

Example 45**5-[6-(2-Methoxyphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide**

6-(2-Methoxyphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (53 mg, 0.22 mmol) was condensed with
 5 5-formyl-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide (65 mg) to give 0.05 g (44%) of the title compound as an orange gum.

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].

Example 46**5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester**

15 5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (60 mg, 0.29 mmol) was condensed with 5-formyl-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester (75 mg) to give 78 mg (60%) of the title compound as an orange solid.

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, 20 2H, OCH₂CH₃), 2.61 (s, 3H, CH₃), 0.98-1.03 (m, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 450 and 452 [M⁺-1 and M⁺+1].

Example 47**5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide**

25 5-bromo-1,3-dihydroindol-2-one (0.47 g, 2.2 mmol) was condensed with 5-formyl-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (0.75 g) to give 0.11 g (42%) of the title compound as an orange solid.

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), 30 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 and 537 [M⁺ and M⁺+2].

mH

Example 48**5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide**

5 A mixture of *tert*-butyl 3-oxobutyrate and sodium nitrite (1 equiv.) in acetic acid was stirred at room temperature to give *tert*-butyl-2-hydroximino-3-oxobutyrate.

Ethyl-3-oxobutyrate (1 equiv.), zinc dust (3.8 equiv.) and the crude *tert*-butyl-2-hydroximino-3-oxobutyrate in acetic acid was stirred at 60° C for 1 hr. The reaction mixture was poured into H₂O and the filtrate was collected to give (65%) 2-*tert*-butyloxycarbonyl-3,5-dimethyl-4-ethoxycarbonylpyrrole.

10 A mixture of 2-*tert*-butyloxycarbonyl-3,5-dimethyl-4-ethoxycarbonylpyrrole and triethyl orthoformate (1.5 equiv.) in trifluoroacetic acid was stirred at 15°C for 1 hour. The reaction was concentrated and the residue was purified to give (64%) 2,4-dimethyl-3-ethoxycarbonyl-5-formylpyrrole as yellow needles.

15 2,4-Dimethyl-3-ethoxycarbonyl-5-formylpyrrole was hydrolyzed using method B to give (90%) 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 12 (br s, 2H, NH and CO₂H), 9.58 (s, 1H, CHO), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃).

MS *m/z* 267 [M⁺].

20 5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (0.17 g, 0.8 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide (0.2 g, prepared by method C) using method B to give 0.3 g (83%) of the title compound as a yellow solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 7.44 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, CONHCH₂), 7.24 (dd, *J* = 1.8 & 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-7), 3.26-3.33 (m, 2H, NCH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, NCH₂), 2.18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

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

Example 49**2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide**

30 6-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (0.17 g, 0.8 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide (0.2 g) to give 0.13 g (36%) of the title compound as a yellow-orange solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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), 7.32-7.36 (m, 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^+].

Example 50

5 5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide

5-Chloro-1,3-dihydroindol-2-one (0.1 g, 0.6 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide (0.15 g) to give 0.22 g (90%) of the title compound as a yellow solid.

10 ^1H NMR (300 MHz, 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-vinyl), 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^+].

15 Example 51

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (0.17 g, 0.8 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (0.2 g) to give 0.09 g (26%) of the title compound as a yellow solid.

20 ^1H NMR (360 MHz, 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-vinyl), 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), 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, $2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3$).

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

Example 52

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

30 5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (0.09 g, 0.4 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (0.1 g) to give 0.14 g (81%) of the title compound as a yellow-orange solid.

^1H NMR (300 MHz, 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-vinyl), 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, $J =$

15

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 456 and 458 [M^+-1 and M^++1].

Example 53

5 5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-yl-propyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (0.09 g, 0.4 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide (0.1 g) to give 0.1 g (59%) of the title compound as an orange solid.

10 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.63 (s, br, 1H, NH), 10.99 (s, br, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-4), 7.77 (s, 1H, H-vinyl), 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, 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).

15 MS-EI m/z 467 and 469 [M^+-1 and M^++1].

Example 54

5-[6-(2-Methoxyphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide

20 6-(2-Methoxyphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (30 mg, 0.13 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide (30 mg) to give 0.06 g (100%) of the title compound as a yellow-orange gum.

^1H NMR (300 MHz, 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-vinyl), 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, 25 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^+].

Example 55

5-[6-(3-Methoxyphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide

30 6-(3-Methoxyphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (30 mg, 0.13 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide (30 mg) to give 8 mg (14%) of the title compound as a yellow-orange solid.

^1H NMR (360 MHz, 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-vinyl), 7.42 (m, 1H, CONHCH_2), 7.36 (d, $J = 7.8$ 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, OCH₃), 3.21-3.33 (m, 2H, NCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.36-2.40 (m, 2H, NCH₂), 2.18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI m/z 458 [M⁺].

5 **Example 56**

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

5-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (80 mg, 0.4 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (0.1 g) using method B
10 to give 79 mg (46%) of the title compound.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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, NCH₂), 2.46-2.55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.44 (s, 6H, 2xCH₃), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

15 MS-EI m/z 456 [M⁺].

Example 57

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

5-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (0.04 g, 0.2 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-
20 dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (0.04 g) to give the title compound as a yellow-orange solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 7.71 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.49 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, CONHCH₂), 7.41-7.46 (m, 3H), 7.31 (m, 1H), 6.95 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.08 (m, 4H, 2x
25 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⁺].

Example 58

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide
30

5-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (8 mg, 0.04 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide (10 mg) to give 10 mg (59%) of the title compound as an orange solid.

16

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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).

5 MS-EI *m/z* 465 [M⁺].

Example 59

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

10 6-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (0.08 g, 0.4 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (0.1 g) to give 65 mg (38%) of the title compound as a yellow solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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),
15 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 456 [M⁺].

Example 60

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

20 6-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (30 mg, 0.15 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (40 mg) to give 5.9 mg (8.5%) of the title compound as a yellow-orange solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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⁺].

Example 61

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide

30 6-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (8 mg, 0.04 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide (10 mg) to give 7.3 mg (43%) of the title compound as an orange solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.62 (s, br, 1H, NH), 10.99 (s, 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, NCH₂CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.93 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, NCH₂).

5 MS-EI *m/z* 465 [M⁺].

Example 62

5-[6-(3,5-Dichlorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

10 6-(3,5-Dichlorophenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (64 mg, 0.23 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (60 mg) to give 53 mg (44%) of the title compound as a light brown solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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, 15 3H, CH₃), 0.97 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, 3xNCH₂CH₃).

MS *m/z* 526.9 [M⁺+1].

Example 63

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

20 6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-one (40 mg, 0.19 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (50 mg) give 29 mg (33%) of the title compound as a light orange solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 25 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⁺].

Example 64

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

30 6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-one (60 mg, 0.28 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (75 mg) to give 90 mg (71%) of the title compound as a light orange solid.

8/7

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-vinyl), 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), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 455 [M⁺].

Example 65**2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-dimethylaminopropyl)amide**

6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-one (42 mg, 0.2 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-dimethylaminopropyl)amide (50 mg) to give 67 mg (75%) of the title compound as yellow-brown solid.

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-vinyl), 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⁺].

Example 66**2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-dimethylaminopropyl)amide**

5-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (67 mg, 0.32 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-dimethylaminopropyl)amide (81 mg) to give 40 mg (28%) of the title compound as an orange solid.

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⁺].

Example 67**2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide**

5-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (1.5 g, 7.16 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (2 g) to give 1.3 g (40%) of the title compound as a yellow-orange solid.

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 and 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 and 2xCH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.93 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

18

MS-EI m/z 470 [M^+].**Example 68****2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide**

5 6-Phenyl-1,3-dihydroindol-2-one (1.5 g, 7.16 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (2 g) to give 1.9 g (57%) of the title compound as an orange solid.

^1H NMR (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 and 2xCH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.93 (t, J = 6.7 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI m/z 470 [M^+].**Example 69**

15 **3-[4-(3-Diethylaminopropylcarbamoyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-4-carboxylic acid (3-chloro-4-methoxyphenyl)amide**

2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-4-carboxylic acid (3-chloro-4-methoxyphenyl)amide (1 g, 3.16 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (1 g, 3.58 mmol) to give 1.7 g (85%) of the title compound as a yellow-orange solid.

20 MS-EI m/z 578.2 [M^+].

Example 70

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylamino-propyl)amide

25 5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (0.5 g, 2.36 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (0.51 g) to give 0.84 g of the title compound as a red-orange solid.

^1H NMR (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 and 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 and 2xCH₃), 2.4 (s, 6H, 2xCH₃), 1.66 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.98 (t, J = 7.1 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI m/z 472 and 474 [$M^+ - 1$ and $M^+ + 1$].**Example 71**

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (100 mg, 0.47 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-diisopropyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (150 mg) to give 0.15 g (62%) of the title compound as a yellow-orange solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.97 (s, 1H, NH), 10.95 (s, 1H, NH), 8.09 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar*H*), 7.84 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.23 (dd, *J* = 1.3 and 8.1 Hz, 1H, Ar*H*), 6.8 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar*H*), 3.5 (m, 1H, CH), 3.3 (m, 3H, CH and NHCH₂), 2.5 (br m, 6H, 3xNCH₂), 1.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, 2xCH₃), 1.23 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, 2xCH₃), 0.96 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 514 and 516 [*M*⁺-1 and *M*⁺+1].

Example 72

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylamino-propyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (90 mg, 0.42 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-diisopropyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide (140 mg) to give 54 mg (25%) of the title compound as red-brown solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.98 (s, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NH), 8.09 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H, H-vinyl), 7.23 (dd, *J* = 1.7 and 8.1 Hz, 1H, Ar*H*), 6.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar*H*), 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, 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 and 530 [*M*⁺-1 and *M*⁺+1].

Example 73

5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide

5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (130 mg, 0.6 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-diisopropyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide (150 mg, 0.45 mmol) to give 36 mg (15%) of the title compound as a tan-orange solid.

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-vinyl), 7.23 (dd, *J* = 1.6 and 7.6 Hz, 1H, Ar*H*), 6.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar*H*), 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 and 528 [*M*⁺-1 and *M*⁺+1].

19

Example 74**5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (pyridin-4-ylmethyl)-amide**

5 5-Bromo-1,3-dihydroindol-2-one (170 mg, 0.8 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (pyridin-4-ylmethyl)amide (200 mg) to give 14 mg (4%) of the title compound as a yellow solid.

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-vinyl), 7.31 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.25 (dd, *J* = 1.9 & 8.1 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H),
10 4.45 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NCH₂), 2.46 (s, 6H, 2xCH₃).

MS-EI *m/z* 450 and 452 [*M*⁺-1 and *M*⁺+1].

Example 75**5-[6-(4-Butylphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide**

15 5-[6-(4-Butylphenyl)]-1,3-dihydroindol-2-one (50 mg, 0.19 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (50 mg) to give 74 mg (76%) of the title compound as an orange solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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, CH₂), 2.52-2.63 (m, 4H, 2xCH₂), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.68 (m, 4H, 2xCH₂), 1.58 (m, 2H, CH₂), 1.34 (m, 2H, CH₂), 0.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 510 [*M*⁺].

Example 76**5-[6-(5-Isopropyl-2-methoxyphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide**

25 6-(5-Isopropyl-2-methoxyphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (50 mg, 0.17 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (45 mg) to give 67 mg (75%) of the title compound as an orange solid.

30 ¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 7.45 (m, 1H, CONH), 7.0-7.19 (m, 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 [$M^+ + 1$].

Example 77

5-[6-(4-Ethylphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

5 6-(4-Ethylphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (45 mg, 0.19 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (50 mg) to give 60 mg (65%) of the title compound as a yellow-orange solid.

1H NMR (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-vinyl), 7.51-7.56 (m, 3H), 7.25-7.30 (m, 3H), 7.08 (d, J = 1 Hz, 1H), 3.31 (m, 2H, CH_2), 2.63 (m, 2H, CH_2CH_3), 2.55 (m, 2H, CH_2), 2.49 (m, 4H, 2x CH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 1.67 (m, 4H, 2x CH_2), 1.20 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH_2CH_3).

MS-EI m/z 482 [M^+].

Example 78

15 5-[6-(2,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

6-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (51 mg, 0.19 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (50 mg) to give 30 mg (31%) of the title compound as an orange solid.

20 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.59 (s, 1H, NH), 10.86 (s, br, 1H, NH), 7.75 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H, H-vinyl), 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, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.33 (m, 2H, CH_2), 2.55 (m, 2H, CH_2), 2.50 (m, 4H, 2x CH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.39 (s, 3H, CH_3), 1.67 (m, 4H, 2x CH_2).

MS-EI m/z 514 [M^+].

25 **Example 79**

5-[6-(3-Isopropylphenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

30 6-(3-Isopropylphenyl)-1,3-dihydroindol-2-one (48 mg, 0.19 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (50 mg) to give 59 mg (63%) of the title compound as an orange solid.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.63 (s, 1H, NH), 10.97 (s, br, 1H, NH), 7.87 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H, H-vinyl), 7.24-7.55 (m, 6H), 7.13 (s, 1H), 3.34 (m, 2H, CH_2), 3.30 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 2.60 (m, 2H, CH_2), 2.50 (m, 4H, 2x CH_2), 2.45 (s, 3H, CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 1.70 (m, 4H, 2x CH_2), 1.27 (d, J = 6.9 Hz, 6H, $CH(CH_3)_2$).

MS-EI m/z 496 [M^+].**Example 80**

5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide

- 5 5-Fluoro-1,3-dihydroindol-2-one (0.54 g, 3.8 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide to give 0.83 g (55%) of the title compound as a yellow green solid.

- 10 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.66 (s, 1H, NH), 10.83 (s, br, 1H, NH), 7.73 (dd, J = 2.5 & 9.4 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H, H-vinyl), 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^+].

Example 80 (Alternative synthesis)**5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide**

- 5 Hydrazine hydrate (55 %, 3000 mL) and 5-fluoroisatin (300 g) were heated to 100 °C. An additional 5-fluoro-isatin (500 g) was added in portions (100 g) over 120 minutes with stirring. The mixture was heated to 110 °C and stirred for 4 hours. The mixture was cooled to room temperature and the solids collected by vacuum filtration to give crude (2-amino-5-fluoro-phenyl)-acetic acid hydrazide (748 g). The hydrazide was suspended in water (700 mL) and the pH of the mixture adjusted to < pH 3 with 12 N hydrochloric acid. The mixture was stirred for 12 hours at room temperature. The solids were collected by vacuum filtration and washed twice with water. The product was dried under vacuum to give 5-fluoro-1,3-dihydro-indol-2-one (600 g, 73 % yield) as a brown powder. ¹H-NMR (dimethylsulfoxide-d₆) δ 3.46 (s, 2H, CH₂), 6.75, 6.95, 7.05 (3 x m, 3H, aromatic), 10.35 (s, 1H, NH). MS *m/z* 152 [M+1].
- 10 3,5-Dimethyl-1H-pyrrole-2,4-dicarboxylic acid 2-tert-butyl ester 4-ethyl ester (2600 g) and ethanol (7800 mL) were stirred vigorously while 10 N hydrochloric acid (3650 mL) was slowly added. The temperature increased from 25 °C to 35 °C and gas evolution began. The mixture was warmed to 54 °C and stirred with further heating for one hour at which time the temperature was 67 °C. The mixture was cooled to 5 °C and 32 L of ice and water were slowly added with stirring. The solid was collected by vacuum filtration and washed three times with water. The solid was air dried to constant weight to give of 2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester (1418 g, 87 % yield) as a pinkish solid. ¹H-NMR (dimethylsulfoxide-d₆) δ 2.10, 2.35 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4.13 (q, 2H, CH₂), 6.37 (s, 1H, CH), 10.85 (s, 1H, NH). MS *m/z* 167 [M+1].
- 15
- 20

82

Dimethylformamide (322 g) and dichloromethane (3700 mL) were cooled in an ice bath to 4 °C and phosphorus oxychloride (684 g) was added with stirring. Solid 2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester (670 g) was slowly added in aliquots over 15 minutes. The maximum temperature reached was 18 °C. The mixture was heated to reflux for one hour, cooled to 10 °C in an ice bath and 1.6 L of ice water was rapidly added with vigorous stirring. The temperature increased to 15 °C. 10 N Hydrochloric acid (1.6 L) was added with vigorous stirring. The temperature increased to 22 °C. The mixture was allowed to stand for 30 minutes and the layers allowed to separate. The temperature reached a maximum of 40 °C. The aqueous layer was adjusted to pH 12-13 with 10 N potassium hydroxide (3.8 L) at a rate that allowed the temperature to reach and remain at 55 °C during the addition. After the addition was complete the mixture was cooled to 10 °C and stirred for 1 hour. The solid was collected by vacuum filtration and washed four times with water to give 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester (778 g, 100 % yield) as a yellow solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.25 (t, 3H, CH₃), 2.44, 2.48 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4.16 (q, 2H, CH₂), 9.59 (s, 1H, CHO), 12.15 (br s, 1H, NH). MS *m/z* 195 [M+1].

5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester (806 g), potassium hydroxide (548 g), water (2400 mL) and methanol (300 mL) were refluxed for two hours with stirring and then cooled to 8 °C. The mixture was extracted twice with dichloromethane. The aqueous layer was adjusted to pH 4 with 1000 mL of 10 N hydrochloric acid keeping the temperature under 15 °C. Water was added to facilitate stirring. The solid was collected by vacuum filtration, washed three times with water and dried under vacuum at 50 °C to give 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic (645 g, 93.5 % yield) acid as a yellow solid. NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.40, 2.43 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 9.57 (s, 1H, CHO), 12.07 (br s, 2H, NH+COOH). MS *m/z* 168 [M+1].

5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (1204 g) and 6020 mL of dimethylformamide were stirred at room temperature while 1-(3-dimethyl-aminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (2071 g), hydroxybenzotriazole (1460 g), triethylamine (2016 mL) and diethylethylenediamine (1215 mL) were added. The mixture was stirred for 20 hours at room temperature. The mixture was diluted with 3000 mL of water, 2000 mL of brine and 3000 mL of saturated sodium bicarbonate solution and the pH adjusted to greater than 10 with 10 N sodium hydroxide. The mixture was extracted twice with 5000 mL each time of 10 % methanol in dichloromethane and the extracts combined, dried over anhydrous magnesium sulfate and rotary evaporated to dryness. The mixture was with diluted with 1950 mL of toluene and rotary evaporated again to dryness. The residue was triturated with 3:1 hexane:diethyl ether (4000 mL). The solids were collected by vacuum filtration, washed twice with 400 mL of ethyl acetate and dried under vacuum at 34 °C for 21 hours to give 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide (819 g, 43 % yield) as a light brown solid. ¹H-NMR (dimethylsulfoxide-*d*₆) δ 0.96 (t, 6H, 2xCH₃), 2.31, 2.38 (2xs, 2 x CH₃), 2.51 (m, 6H 3xCH₂), 3.28 (m, 2H, CH₂), 7.34 (m, 1H, amide NH), 9.56 (s, 1H, CHO), 11.86 (s, 1H, pyrrole NH). MS *m/z* 266 [M+1].

5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)-amide (809 g), 5-fluoro-1,3-dihydro-indol-2-one (438 g), ethanol (8000 mL) and pyrrolidine (13 mL) were heated at 78 °C for 3 hours. The mixture was cooled to room temperature and the solids collected by vacuum filtration and washed with ethanol. The solids were stirred with ethanol (5900 mL) at 72 °C for 30 minutes. The mixture was cooled to room temperature. The solids were collected by vacuum filtration, washed with ethanol and dried under vacuum at 54 °C for 130 hours to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3*Z*)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide (1013 g, 88 % yield) as an orange solid. ¹H-NMR (dimethylsulfoxide-*d*₆) δ 0.98 (t, 6H, 2xCH₃), 2.43, 2.44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 6H, 3xCH₂), 3.28 (q, 2H, CH₂), 6.84, 6.92, 7.42, 7.71, 7.50 (5xm, 5H, aromatic, vinyl, CONH), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.68 (s, 1H, pyrrole NH). MS *m/z* 397 [M-1].

Example 81

3-[4-(2-Diethylaminoethyl)carbamoyl]-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)methylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indole-6-carboxylic acid

2-Oxo-2,3-dihydro-1*H*-indole-6-carboxylic acid (80 mg, 0.45 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide to give 210 mg (92%) of the title compound as a yellow orange solid.

gr

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.6 (s, 1H, NH), 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H, H-vinyl), 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-piperidine), 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).

5 MS *m/z* 424 [M⁺].

Example 82

5-(5-Dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid dimethylamide (90 mg, 0.38 mmol) was
10 condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (100 mg) to give 100 mg (54%) of the title compound as a yellow solid.

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-vinyl), 7.48-7.53 (m, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.33 (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,
15 CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 485 [M⁺].

Example 83

5-[5-(3-Chlorophenyl)sulfamoyl]-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide

20 2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid (3-chloro-phenyl)amide (120 mg, 0.38 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (100 mg) to give 150 mg (69%) of the title compound as a yellow orange solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.55 (s, 1H, NH), 11.26 (br s, 1H, NH), 10.30 (br
25 s, 1H, NH), 8.26 (d, 1H), 7.79 (s, 1H, H-vinyl), 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⁺].

Example 84**2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-5-(pyridin-3-ylsulfamoyl)-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide**

2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid pyridin-3-ylamide (110 mg, 0.38 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amide (100 mg) to give 150 mg (74%) of the title compound as an orange solid.

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-vinyl), 7.49-7.54 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.33 (m, 2H, CH₂), 2.56 (t, *J* = 7.06 Hz, 2H, CH₂), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.43 (s, 6H, 2xCH₃), 1.68 (m, 4H, 2xCH₂).

MS *m/z* 535 [M⁺].

Example 85**3-[3,5-Dimethyl-4-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-4-(2-hydroxyethyl)-1,3-dihydroindol-2-one**

4-(2-Hydroxyethyl)-1,3-dihydroindol-2-one (71 mg, 0.4 mmol) was condensed with 3,5-dimethyl-4-(4-methyl-piperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrole-2-carbaldehyde to give 90 mg (55%) of the title compound as an orange solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14.25(s, 1H, NH), 10.88 (s, 1H, NH), 7.57 (s, 1H, H-vinyl), 7.03 (m, 1H), 6.75-6.82 (m, 2H), 4.86 (m, 1H, OH), 3.70 (m, 2H, CH₂), 3.04 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 4H, 2xCH₂), 2.28 (br s, 7H), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃).

MS *m/z* (+ve) 409.3 [M⁺].

Example 86**3-[3,5-Dimethyl-4-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid phenylamide**

2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid phenylamide (110 mg, 0.4 mmol) was condensed with 3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrole-2-carbaldehyde (100 mg) to give 50 mg (24%) of the title compound as a yellow solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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, 2xCH₂), 2.28 (m, 10H, 2xCH₃ & 2xCH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃).

MS-EI *m/z* 519 [M⁺].

Example 87

83

5-(5-Dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid dimethylamide (90 mg, 0.38 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-

5 diethylaminoethyl)amide (100 mg) to give 80 mg (43%) of the title compound as a yellow solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.30 (s, 1H, NH), 8.27 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H, H-vinyl), 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, 10 2xCH₃ & N(CH₂CH₃)₂), 0.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 487 [M⁺].

Example 88

5-[5-(3-Chlorophenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

15 2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid (3-chloro-phenyl)amide (120 mg, 3.8 mmol) was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide (100 mg) to give 80 mg (37%) of the title compound as a yellow solid.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.55 (s, 1H, NH), 11.24 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, 20 NH), 8.25 (d, *J* = 1.87 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H, H-vinyl), 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 (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⁺].

25 **Example 95**

3-(2-Oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid ethyl ester

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-vinyl), 7.70 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.49 (dd, *J* = 1.7 & 8.0 Hz, 1H), 30 7.44 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.32 (m, 1H), 6.96 (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⁺].

Example 99

3-(2-Oxo-5-phenylsulfamoyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid ethyl ester

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.64 (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-vinyl), 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⁺].

10 Example 109

3-[3-(Morpholine-4-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindol-1-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid

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-vinyl), 7.62 (dd, *J* = 1.4 & 7.8 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 3.65 (m, 4H, 2xCH₂), 3.55 (m, 4H, 2xCH₂), 2.81 (m, 2H, CH₂), 2.54 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 421 [M⁺].

Example 112

5-Bromo-3-[3-(pyrrolidine-1-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindol-1-ylmethylene]-1,3-dihydro-indol-2-one

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.56 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH), 8.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H-vinyl), 7.28 (dd, *J* = 1.3 & 8.3 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.57 (m, 4H, 2xCH₂), 2.79 (m, 2H, CH₂), 2.65 (m, 2H, CH₂), 1.88 (m, 4H, 2xCH₂), 1.71 (m, 4H, 2xCH₂).

25 MS-EI *m/z* 439 & 441 [M⁺-1] & [M⁺+1].

Example 114

3-(3-Dimethylcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 7.62 (dd, *J* = 1.3 & 7.9 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 3.03 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.81 (m, 2H, CH₂), 2.55 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 379 [M⁺].

Example 115**4-Methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.56 (br s, 1H, NH), 8.24 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H, H-vinyl), 7.74 (d, J = 2.96 Hz, 1H), 7.56 (dd, J = 1.5 & 8.1 Hz, 1H), 7.20 (br m, 1H, NHCH₃), 7.03 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 2.57 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃).

MS-EI m/z 361 [M⁺].

Example 116**{[4-Methyl-5-(4-methyl-5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl]-amino}-acetic acid ethyl ester**

4-Methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester (lit. ref. D.O. Cheng, T. L. Bowman and E. LeGoff, J. Heterocyclic Chem.; 1976; 13; 1145-1147) was formylated using method A, hydrolysed using method B followed by amidation (method C) to give [(5-formyl-4-methyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino]-acetic acid ethyl ester.

4-Methyl-5-methylaminosulfonyl-2-oxindole (50 mg, 0.21 mmol) was condensed with [(5-formyl-4-methyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino]-acetic acid ethyl ester (100 mg, 0.42 mmol) and piperidine (0.1 mL) in ethanol (2 mL) to give 50 mg (52%) of the title compound.

¹H NMR (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-vinyl), 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), 2.86 (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⁺].

Example 117**{[4-Methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl]-amino}-acetic acid ethyl ester**

A mixture of 5-methylaminosulfonyl-2-oxindole (0.06 g, 0.22 mmol), [(5-formyl-4-methyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino]-acetic acid ethyl ester (0.075 g, 0.27 mmol) and piperidine (2 drops) in ethanol (5 mL) was heated in a sealed tube at 90° C for 12 hrs. After cooling, the precipitate was collected by vacuum filtration, washed with ethanol, triturated with dichloromethane/ether and dried to give 0.035 g (36%) of the title compound as a yellowish brown solid.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 7.84 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 1.9 & 8.5 Hz, 1H), 7.14 (br m, 1H, NHCH₃), 7.04 (d, J = 8.5 Hz, 1H),

4.11 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.92 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, GlyCH_2), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.41 (m, 3H, NCH_3), 1.20 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

MS m/z 446 $[\text{M}^+]$.

Example 118

5 {[4-Methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl]-amino}-acetic acid

A mixture of [(5-formyl-4-methyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino]-acetic acid ethyl ester (0.142 g, 0.59 mmol) and 1N NaOH (1.2 mL) in methanol (10 mL) was stirred at room temperature for 1 hr. The reaction was concentrated and the residue was condensed with 5-methylaminosulfonyl-2-oxindole (0.13 g, 0.48 mmol) and piperidine (0.12 mL) in ethanol (12 mL) to give 0.11 g (52%) of the title compound.

$^1\text{HNMR}$ (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, CH_2NH), 2.54 (s, 3H, pyrrole- CH_3), 2.39 (s, 3H, ArCH_3).

15 MS m/z 417 $[\text{M}-1]^+$.

Example 120

5-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.77 (br s, 1H, NH), 12.49 (s, 1H, COOH), 11.07 (s, 1H, NH), 8.39 (s, 1H, H-vinyl), 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, CH_3).

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

Example 121

5-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester

25 $^1\text{HNMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.79 (s, 1H, NH), 11.08 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H-vinyl), 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), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

MS m/z 297.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Example 122

30 2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester

$^1\text{HNMR}$ (360 MHz, DMSO-d_6) δ 13.72 (s, 1H, NH), 11.16 (s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, H-vinyl), 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, OCH_2CH_3), 2.35 (s, 3H, CH_3), 1.33 (t, $J = 7.03$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

48

MS m/z 375 & 377 $[M+H]^+$.**Example 123****2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid**

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.72(s, 1H, NH), 12.57 (s, 1H, COOH), 11.19 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H-vinyl), 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, CH₃).

MS m/z 347 & 349 $[M+H]^+$.**Example 124****2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid****(2-pyrrolidin-1-ylethyl)-amide**

To a solution of 2-formyl-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (250 mg, 1.63 mmol) in dimethylformamide (3 mL) was added 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (376 mg, 1.2 equiv.), 1-hydroxybenzotriazole (265 mg, 1.2 equiv.), triethylamine (0.45 mL, 2 equiv.) and 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine (0.23 mL, 1.1 equiv.). After stirring at room temperature overnight, the reaction was diluted with saturated sodium bicarbonate and brine (with extra salt) and extracted with 10% methanol in dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give 130 mg of 2-formyl-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide.

A mixture of 5-bromo-2-oxindole (106 mg, 0.5 mmol), 2-formyl-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide (125 mg, 1 equiv.) and piperidine (0.2 mL) in ethanol (2 mL) was heated in a sealed tube at 80°C for 1 hr and then cooled. The precipitate which formed was collected by vacuum filtration, washed with ethanol and ethyl acetate and dried to give the title compound as an orange solid.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.62 (s, 1H, NH), 11.06 (br s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, H-vinyl), 8.15 (m, 1H, CONHCH₂), 7.48 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 1.8 & 7.9 Hz, 1H), 6.86 (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 $[M^+$ and $M^++2]$.**Example 125****2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid**
(2-diethylaminoethyl)-amide

To a solution of 2-formyl-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (320 mg, 2.1 mmol) in dimethylformamide (3 mL) was added 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (483 mg, 1.2 equiv.), 1-hydroxybenzotriazole (340 mg, 1.2 equiv.), triethylamine (0.59 mL, 2 equiv.) and N,N-diethylethylenediamine (0.32 mL, 1.1 equiv.). After stirring at room

temperature overnight, the reaction was diluted with saturated sodium bicarbonate and brine (with extra salt) and extracted with 10% methanol in dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give 2-formyl-5-methyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)-amide.

5 A mixture of 5-bromo-2-oxindole (106 mg, 0.5 mmol), 2-formyl-5-methyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide (126 mg, 1 equiv.) and piperidine (0.2 mL) in ethanol (2 mL) was heated in a sealed tube at 80°C for 1 hr and then cooled. The precipitate was collected by vacuum filtration, washed with ethanol and ethyl acetate and dried to give the title compound as an orange solid.

10 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.62 (s, 1H, NH), 11.11 (br s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, H-vinyl), 8.1 (m, 1H, CONHCH₂), 7.49 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 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, HNCH₂CH₂), 2.59 (m, 6H, 3xCH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 0.99 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS *m/z* 445/ 447 [M⁺ and M⁺+2].

15 **Example 126**

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide

20 A mixture of 1,3-dihydro-indol-2-one (266 mg, 2 mmol), 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide (530 mg, 2 mmol) and piperidine (1 drop) in ethanol was heated at 90°C for 2 hours. The reaction was cooled to room temperature, the resulting precipitate was collected by vacuum filtration, washed with ethanol and dried to give 422 mg (55%) of the title compound as a light yellow solid.

25 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13.7 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, NH), 7.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H, H-vinyl), 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, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS + ve APCI 381 [M⁺ + 1].

30 **Example 127**

5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide

35 A mixture of 5-Chloro-1,3-dihydro-indol-2-one (335 mg, 2 mmol), 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide (530 mg, 2 mmol) and piperidine (1 drop) in ethanol was heated at 90°C for 2 hours. The reaction was cooled to room temperature, the resulting precipitate was collected by vacuum filtration, washed with ethanol and dried to give 565 mg (68%) of the title compound as an orange solid.

fb

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13.65 (s, 1H, NH), 11.0 (s, 1H, NH), 7.98 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H) 7.77 (s, 1H H-vinyl), 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, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂)

5 MS + ve APCI 415 [M⁺ + 1].

Example 128

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-ethyl)-amide

10

1,3-Dihydro-indol-2-one was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide to give the title compound.

MS + ve APCI 379 [M⁺ + 1].

15 **Example 129**

5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide

20 5-Fluoro-1,3-dihydro-indol-2-one was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide to give the title compound.

MS + ve APCI 397 [M⁺ + 1].

Scale-up procedure:

25 5-Formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (61 g), 5-fluoro-1,3-dihydro-indol-2-one (79 g), ethanol (300 mL) and pyrrolidine (32 mL) were refluxed for 4.5 hours. Acetic acid (24 mL) was added to the mixture and refluxing was continued for 30 minutes. The mixture was cooled to room temperature and the solids collected by vacuum filtration and washed twice with ethanol. The solids were stirred for 130 minutes in 40 % acetone in water (400 mL) containing 12 N hydrochloric acid (6.5 mL). The solids were collected by vacuum
30 filtration and washed twice with 40 % acetone in water. The solids were dried under vacuum to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (86 g, 79 % yield) as an orange solid. ¹H-NMR (dimethylsulfoxide-d₆) δ 2.48, 2.50 (2xs, 6H, 2xCH₃), 6.80, 6.88, 7.68, 7.72 (4xm, 4H, aromatic and vinyl), 10.88 (s, 1H, CONH), 12.12 (s, 1H, COOH), 13.82 (s, 1H, pyrrole NH). MS *m/z* 299 [M-1].

35 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (100 g) and dimethylformamide (500 mL) were stirred and benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (221 g), 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine (45.6 g) and triethylamine (93 mL) were added. The mixture was stirred for 2 hours at ambient temperature. The solid product was collected by vacuum
40 filtration and washed with ethanol. The solids were slurry-washed by stirring in ethanol (500 mL) for one hour at 64 °C and cooled to room temperature. The solids were collected by

vacuum filtration, washed with ethanol, and dried under vacuum to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide (101.5 g, 77 % yield). ¹H-NMR (dimethylsulfoxide-d₆) δ 1.60 (m, 4H, 2xCH₂), 2.40, 2.44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 4H, 2xCH₂), 2.57, 3.35 (2xm, 4H, 2XCH₂), 7.53, 7.70, 7.73, 7.76 (4xm, 4H, aromatic and vinyl), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.67 (s, 1H, pyrrole NH). MS *m/z* 396 [M+1].

Example 130

5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide

5-Chloro-1,3-dihydro-indol-2-one was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide to give the title compound.

MS + ve APCI 413 [M⁺ + 1].

Example 131

2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)-amide

1,3-Dihydro-indol-2-one was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide to give the title compound.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13.63 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH), 7.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H H-vinyl), 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, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂)
MS + ve APCI 353 [M⁺ + 1].

Example 132

5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)-amide

5-Fluoro-1,3-dihydro-indol-2-one was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylaminoethyl)amide to give the title compound.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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-vinyl), 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, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂)
MS + ve APCI 371 [M⁺ + 1].

Example 193

5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-ethylamino-ethyl)-amide

81

5-Formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-ethylamino-ethyl)-amide (99 g), ethanol (400 mL), 5-fluoro-2-oxindole (32 g) and pyrrolidine (1.5 g) were refluxed for 3 hours with stirring. The mixture was cooled to room temperature and the solids collected by vacuum filtration. The solids were stirred in ethanol at 60 °C, cooled to room temperature and collected by vacuum filtration. The product was dried under vacuum to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-ethylamino-ethyl)-amide (75 g, 95 % yield). ¹H-NMR (dimethylsulfoxide-d₆) 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, aromatic, vinyl and CONH), 10.90 (br s, 1H, CONH), 13.65 (br s, 1H, pyrrole NH). MS *m/z* 369 [M-1].

Example 195**5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethyl-N-oxoamino-ethyl)-amide****Method A:**

5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide (598 mg) and dichloromethane (60 mL) in an ice bath were treated with 3-chloroperoxybenzoic acid (336 mg) and the mixture stirred at room temperature overnight. The solvent was rotary evaporated and the residue suspended in methanol (20 mL). Water (20 mL) containing sodium hydroxide (240 mg) was added and the mixture stirred for one hour. The precipitate was collected by vacuum filtration, washed with 5 mL of water and dried under a vacuum to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethyl-N-oxoamino-ethyl)-amide (510 mg, 82 % yield) as an orange solid. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 13.72 (br s, 1H, NH), 11.02 (br s, 1H, CONH), 9.81 (br s, 1H, CONH), 7.75 (dd, 1H, aromatic), 7.70 (s, 1H, aromatic), 6.93 (td, 1H, aromatic), 6.84 (m, 1H, aromatic), 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].

Method B:

5-Formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide (10 g) was suspended in dichloromethane (100 mL) and cooled in an ice bath. 3-Chloroperoxybenzoic acid (13.1 g) was added with stirring and the mixture allowed to warm to room temperature and then stirred overnight. The mixture was rotary evaporated to dryness and chromatographed on a column of silica gel eluting with 20 % methanol in dichloromethane. Fractions containing product were combined and rotary evaporated to dryness to give 5-

formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethyl-N-oxoamino-ethyl)-amide (9 g, 83 % yield).

5-Formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethyl-N-oxoamino-ethyl)-amide (9 g), 5-fluoro-1,3-dihydro-indol-2-one ((9 g, 83 % yield)), and pyrrolidine ((9 g, 83 % yield (0.1 g) were refluxed in ethanol (30 mL) for 4 hours. The mixture was cooled in an ice bath and the precipitate collected by vacuum filtration and washed with ethanol. The solids were stirred in ethyl acetate (30 mL), collected by vacuum filtration, washed with ethyl acetate and dried under vacuum to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethyl-N-oxoamino-ethyl)-amide (10.3 g 80 % yield) as an orange solid. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 13.72 (br s, 1H, NH), 11.02 (br s, 1H, CONH), 9.81 (br s, 1H, CONH), 7.75 (dd, 1H, aromatic), 7.70 (s, 1H, aromatic), 6.93 (td, 1H, aromatic), 6.84 (m, 1H, aromatic), 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].

Example 190

5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]-amide.

5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (120 mg, 0.4 mmol) was shaken with EDC, HCl (96 mg, 0.5 mmol), anhydrous 1-hydroxy-benzotriazole (68 mg, 0.5 mmol), and 2-(2-aminoethylpyridine purchased from Aldrich in anhydrous DMF (3 mL) for 2-3 days at room temperature. The reaction mixture was diluted with 1M NaHCO₃ (1.5 ml), then with 8 ml of water. The precipitated crude product was collected by filtration, washed with water, dried and purified by crystallization or chromatography to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)-ethyl]amide.

Example 189

5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amide.

Proceeding as described in previous example but substituting 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid with 5-[5-chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (127 mg) provided 5-[5-chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amide.

CB

Example 192

5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amide.

Proceeding as described in Example 190 above but substituting 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid with 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (145 mg) provided 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amide.

Example 191

5-[2-Oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amide

Proceeding as described in Example 190 above but substituting 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidene-methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid with 5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (113 mg) provided 5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amide.

Example 203

5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amide

Proceeding as described in Example 190 above but substituting 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid with 5-[5-cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (123 mg) provided 5-[5-cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amide.

Examples 142, 186, 187, 188 and 204

Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine, purchased from Aldrich Chemical Company, Inc. provided the desired compounds.

Examples 143-147

Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with 1-(2-aminoethyl)imidazolin-2-one (prepared by heating dimethyl carbonate with bis(2-aminoethyl) amine (2 equivalents) in a sealed flask to 150 °C for 30 min., following the procedure described in U.S. Patent 2613212 (1950), to Rohm & Haas Co. The crude product was purified on silica using an eluent mixture chloroform-methanol-aqueous ammonia 80:25:2) provided the desired compounds.

Examples 148-151 and 184

Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with 4-(2-aminoethyl)piperazine-1-acetic acid ethyl ester (prepared as follows: Piperazine-1-acetic acid ethyl ester (11.22 g) was treated with iodoacetonitrile (5.0 mL) in the presence of potassium carbonate (6.9 g) in ethyl acetate (260 mL) at 0 °C. After complete iodoacetonitrile addition (45 min), the reaction mixture was subsequently stirred at room temperature for 11 hours. The reaction mixture was filtered and the filtrates evaporated. The residue was hydrogenated in a presence of cobalt boride (prepared from CoCl₂ and sodium borohydride) at room temperature at 50 psi for 2 days in ethanol. Filtration, evaporation and chromatographic purification using an eluent mixture chloroform-methanol-aqueous ammonia 80:25:2 provided the desired amine (3.306 g) as a pale yellow oil) provided the desired compounds.

Example 152-153

Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with 2-[(2-aminoethylamino)]acetonitrile (prepared as follows: A solution of iodoacetonitrile (50 mmol) in ethyl alcohol (80 ml) was added to a solution of ethylene diamine (150 ml) in ethyl alcohol (60 ml) at 0 °C over a period of 30 minutes. The stirring was continued for another 1 hr at 0 °C, then at room temperature for 14 hours. 55 mmol of potassium carbonate was added, stirred for 30 minutes, filtered and the filtrate was concentrated at room temperature. The residue was purified on silica using an eluent mixture chloroform-methanol-aqueous ammonia 80:15:1.5 to give 2-[(2-aminoethylamino)]-acetonitrile (3.550 g) which was used immediately) provided the desired compounds.

Example 154-158

Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with 1-(3-aminopropyl)-azepin-2-one (prepared according to the procedure in Kraft A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14, except that the hydrolysis of DBU was performed at 145 °C neat in a presence of lithium hydroxide (1 hr, 5 ml of DBU, 2 ml of water, 420 mg of lithium hydroxyde hydrate). Purification of the crude product on silica using an eluent mixture chloroform-methanol-aqueous ammonia 80:40:4 provided 1-(3-aminopropyl)azepin-2-one (4.973g, 87 % yield)) provide the desired compounds.

Examples 133-135, 159 and 200

Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with N-acetyl ethylene diamine, (prepared by heating a

89

mixture of ethyl acetate with ethylene diamine (1.5 equivalents) to 160 °C for 1 hr in a sealed vessel. The vacuum distillation provided the desired product in 56% yield. N-acetylene diamine is also available from Aldrich) provide the desired compounds.

Examples 146-140

- 5 Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with 1-(3-aminopropyl)-tetrahydro-pyrimidin-2-one (prepared in the same way as 1-(3-aminopropyl)-azepin-2-one according to the procedure in Kraft A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14: Briefly, 1,3,4,6,7,8-hexahydro-2H-pyrimido[1,2-a]pyrimidine (4.939 g), lithium hydroxyde hydrate (918 mg) and 2 ml of water
10 was heated without a solvent in a sealed vessel to 145 °C for 1hr. The crude product was purified on a column of silica in chloroform-methanol-aqueous ammonia 80:40:4 to give pure amine (5.265g, 94% yield).

Examples 141, 160-162 and 185

- Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but
15 substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with 1-(2-aminoethyl)-piperazine-2-one (prepared as follows: Neat tert-butyldiphenylsilyl chloride (25 mL, 97.7 mmol) was added dropwise into a solution of DBU (19.5 ml, 130 mmol) and bis(2-aminoethyl)amine (4.32 mL, 40 mmol) in anhydrous dimethyl acetamide (80 mL) at room temperature upon cooling on water bath within 5 minutes. The mixture was stirred for 5 hours. Bromoacetic acid ethyl ester (6.70 mL, 60
20 mmol) was added neat upon cooling to room temperature. The reaction was stirred for 25 minutes, then evaporated on high vacuum. The residue was dissolved in methanol (200 ml), KHCO₃ (10g) and KF (12 g, 200 mmol) were added and the mixture was stirred at 60 °C for 5 hours. 10g of Na₂CO₃ was added, stirred for 10 minutes, cooled and filtered. The filtrates were evaporated. The residue was extracted with hexanes (2 times 250 ml). The hexane-insoluble
25 material was dissolved in ethanol (60ml), filtered and evaporated. The residue was purified on a column of silica in chloroform-methanol-aqueous ammonia 80:40:4 to give pure amine (4.245g, 74% yield)) provided the desired compounds.

Examples 163-167

- Proceeding as described in Examples 190, 189, 191, 192, and 203 above but
30 substituting 2-(2-aminoethyl)pyridine with 3-[(2-aminoethyl)amino]propionitrile (prepared from ethylene diamine (150 mmol) and acrylonitrile (50 mmol) in THF at room temperature, as described in Israel, M. et al: J. Med Chem. 7, 1964, 710-16., provided the desired amine (4.294 g)) provided the desired compounds.

Example 168**5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-methylpiperazin-1-yl)-ethyl]-amide**

To a stirred yellow muddy mixture of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-

ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (90 mg), DMF (0.8 mL) and TEA (0.084 mL) in a 20 mL reaction tube, was added BOP reagent (199 mg). The mixture became clear in 5 min. 2-(4-Methylpiperazin-1-yl)ethylamine¹ (51 mg) was added into the clear mixture. The resulting solution was stirred at room temperature over night. Yellow solid

products precipitated from the reaction system. Thin layer chromatography (10% methanol in methylene chloride) showed that all the starting material had been converted into the product.

The solid was isolated by vacuum filtration and washed once with ethanol (1 mL). The solid was sonicated in diethyl ether (2 mL) for 20 min and collected by vacuum filtration. After drying under vacuum, 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (4-methylpiperazin-1-yl-ethyl)-amide (79 mg, 62% yield) was obtained.

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) (aromatic and vinyl), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.67 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 424.4 (M-1).

Example 169**5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (4-methylpiperazin-1-yl-ethyl)-amide**

Following the procedure in Example 168 above but substituting 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid with 5-[5-chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (95 mg, 0.3 mmol) gave 5-(5-chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (4-methylpiperazin-1-yl-ethyl)-amide (76 mg, 58%).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.41, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2.42 (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) (aromatic and vinyl), 10.98 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 440.2 (M-1).

90

Example 170**5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (4-methylpiperazin-1-yl-ethyl)-amide**

Following the procedure described in Example 168, but substituting 5-(5-chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid with 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid gave 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (4-methylpiperazin-1-yl-ethyl)-amide (39 mg, 54%) was obtained from 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) (aromatic and vinyl), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.61 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 486.6 (M).

Example 172**5-(2-Oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (4-methylpiperazin-1-yl-ethyl)-amide**

Following the procedure described in Example 168 above but substituting 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid SU014900 with 5-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid gave 5-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (4-methylpiperazin-1-yl-ethyl)-amide, (136 mg, 84%) was obtained (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) (aromatic and vinyl), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.61 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 406.6 (M-1).

Example 171**5-[2-Oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amide**

To a stirred yellow muddy mixture of 5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (112.8 mg, 0.4 mmol), DMF (0.5 mL) and triethylamine (0.111 mL) in a 20 mL reaction tube, was added BOP reagent (265 mg). The mixture became clear in 5 min. 2-(2,6-dimethylpiperazin-1-yl)ethylamine (68.6 mg) (see., Tapia, L. Alonso-Cires, P. Lopez-Tudanca, R. Mosquera, L. Labeaga, A. Innerarity, A. Orjales, J. Med. Chem., 1999, 42, 2870-2880) was added into the clear mixture. The resulting

solution was stirred at room temperature over night. Thin layer chromatography (10% methanol in methylene chloride) showed that all the starting material had been converted into the product. The reaction mixture was evaporated to dryness and then purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/CH₃OH=20/1-15/1) followed by recrystallization to give 5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amide (83 mg, 50% yield).

¹H NMR (DMSO-d₆) 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) (aromatic and vinyl), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 422.2 (M+1).

Example 173

5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amide

Following the procedure described in Example 168 above the desired compound was obtained (60 mg, 0.2 mmol).

¹H NMR (DMSO-d₆) 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=8.4Hz, 1H), 7.42 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.74 (dd, J=4.6, 8.4Hz, 1H) (aromatic and vinyl), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.65 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 438.4 (M-1).

Example 174

5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amide

Following the procedure for Example 171 above the desired compound (31.2 mg, 34%) was obtained from 5-[5-chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (63 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=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, J=5.6Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.97 (d, J=2.0Hz, 1H) (aromatic and vinyl), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.63 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 456.2 (M+1).

98

Example 175

5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amide

Following the procedure described in Example 171 the desired compound (40 mg, 40%) was obtained from 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (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) (aromatic and vinyl), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 498.4 (M-1).

Example 205

(3Z)-3-[(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)-methylidene]-1-[1-(4-methylpiperazinyl)methyl]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one

N-Methylpiperazine (10 g, 100 mmol) was added to a stirred solution of aqueous formaldehyde (10 g of 38% solution, 100 mmol) and 3-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylidene)-1,3-dihydro-indol-2-one, (2.38 g, 10 mmol) in methanol (100 mL). The solution heated at 60 °C for 1 h, concentrated to a low volume and the precipitate was filtered off, washed with methanol, and dried to give 2.38 g of the title compound, mp 160-164 °C.

HPLC Rt 4.72 min. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.26 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.43 (br s, 4H), 2.70 (br s, 4H), 4.59 (s, 2H), 5.96 (d, 1H), 7.02-7.08 (m, 2H), 7.15 (dd, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.48 (dd, 1H) and 13.0 (br s, 1H). Anal. Calcd for C₂₁H₂₆N₄O: C, 71.97; H, 7.48; N, 15.99. Found: C, 71.75; H, 7.46; N, 15.87.

(3Z)-3-[(3,5-Dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)-methylidene]-1-[1-(4-methylpiperazinyl)-methyl]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one was converted to a dihydrochloride salt.

Example 206

Synthesis of (3Z)-3-[(3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-methylidene]-1-(1-pyrrolidinylmethyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-one

Pyrrolidine (450 mg, 6.3 mmol) was added to a stirred solution of aqueous formaldehyde (500 mg of 38% solution, 6.0 mmol) and 3-(3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-ylmethylidene)-1,3-dihydro-indol-2-one, (900 mg, 3.8 mmol) in methanol (50 mL). After 15 min, the solution was cooled to 0 °C and the precipitate was filtered off, washed with water, and dried to give 1.08 g of the title compound, mp 129-132 °C. HPLC Rt 4.87 min. ¹H NMR [(CD₃)₂SO] δ 1.65 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.62 (m, 4H), 4.72 (s, 2H) 6.07 (d, 1H), 7.00 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.76 (d, 2H) and 13.1 (br s, 1H). Anal. Calcd for C₂₀H₂₃N₃O: C, 74.74; H, 7.21; N, 13.07. Found: C, 74.61; H, 7.25; N, 13.03.

Biological Examples**15 Protein kinase inhibitors of Formula (I):**

The following assays may be used to determine the level of activity and effect of the compounds of Formula (I) on one or more of the protein kinases (hereinafter PKs). Similar assays can be designed along the same lines for any PK using techniques well known in the art.

A. Assay Procedures.

Several of the assays described herein are performed in an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Sandwich Assay) format (Voller, *et al.*, 1980, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," Manual of Clinical Immunology, 2d ed., Rose and Friedman, Am. Soc. Of Microbiology, Washington, D.C., pp. 359-371). The general procedure is as follows: a compound of Formula (I) is introduced to cells expressing the test kinase, either naturally or recombinantly, for a selected period of time after which, if the test kinase is a receptor, a ligand known to activate the receptor is added. The cells are lysed and the lysate is transferred to the wells of an ELISA plate previously coated with a specific antibody recognizing the substrate of the enzymatic phosphorylation reaction. Non-substrate components of the cell lysate are washed away and the amount of phosphorylation on the substrate is detected with an antibody specifically recognizing phosphotyrosine compared with control cells that were not contacted with a test compound.

The presently preferred protocols for conducting the ELISA experiments for specific PKs is provided below. However, adaptation of these protocols for determining the activity of compounds against other receptor tyrosine kinases (RTKs), as well as for cytoplasm tyrosine

a2

kinases (CTKs) and serine threonine tyrosine kinases (STKs), is well within the scope of knowledge of those skilled in the art. Other assays described herein measure the amount of DNA made in response to activation of a test kinase, which is a general measure of a proliferative response. The general procedure for this assay is as follows: a compound is introduced to cells expressing the test kinase, either naturally or recombinantly, for a selected period of time after which, if the test kinase is a receptor, a ligand known to activate the receptor is added. After incubation at least overnight, a DNA labeling reagent such as 5-bromodeoxyuridine (BrdU) or H^3 -thymidine is added. The amount of labeled DNA is detected with either an anti-BrdU antibody or by measuring radioactivity and is compared to control cells not contacted with a test compound.

GST-FLK-1 BIOASSAY

This assay analyzes the tyrosine kinase activity of GST-Flk1 on poly(glu,tyr) peptides.

Materials and Reagents:

1. Corning 96-well ELISA plates (Corning Catalog No. 5805-96).
2. poly(glu,tyr) 4:1, lyophilizate (Sigma Catalog # P0275).
3. Preparation of poly(glu,tyr)(pEY) coated assay plates: Coat 2 ug/well of poly(glu,tyr)(pEY) in 100 ul PBS, hold at room temperature for 2 hours or at 4°C overnight. Cover plates well to prevent evaporation.
4. PBS Buffer: for 1 L, mix 0.2 g KH_2PO_4 , 1.15 g Na_2HPO_4 , 0.2 g KCl and 8 g NaCl in approx. 900ml dH_2O . When all reagents have dissolved, adjust the pH to 7.2 with HCl. Bring total volume to 1 L with dH_2O .
5. PBST Buffer: to 1 L of PBS Buffer, add 1.0 ml Tween-20.
6. TBB - Blocking Buffer: for 1 L, mix 1.21 g TRIS, 8.77 g NaCl, 1 ml TWEEN-20 in approximately 900 ml dH_2O . Adjust pH to 7.2 with HCl. Add 10 g BSA, stir to dissolve. Bring total volume to 1 L with dH_2O . Filter to remove particulate matter.
7. 1% BSA in PBS: To make a 1x working solution, add 10 g BSA to approx. 990 ml PBS buffer, stir to dissolve. Adjust total volume to 1 L with PBS buffer, filter to remove particulate matter.
8. 50 mM Hepes pH 7.5.
9. GST-Flk1cd purified from sf9 recombinant baculovirus transformation (SUGEN, Inc.).
10. 4% DMSO in dH_2O .
11. 10 mM ATP in dH_2O .

12. 40 mM MnCl_2
13. Kinase Dilution Buffer (KDB): mix 10 ml Hepes (pH 7.5), 1 ml 5M NaCl, 40 μL 100 mM sodium orthovanadate and 0.4 ml of 5% BSA in dH_2O with 88.56 ml dH_2O .
- 5 14. NUNC 96-well V bottom polypropylene plates, Applied Scientific Catalog # AS-72092
15. EDTA: mix 14.12 g ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to approx. 70 ml dH_2O . Add 10 N NaOH until EDTA dissolves. Adjust pH to 8.0. Adjust total volume to 100 ml with dH_2O .
- 10 16. 1° Antibody Dilution Buffer: mix 10 ml of 5% BSA in PBS buffer with 89.5 ml TBST.
17. Anti-phosphotyrosine monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech).
18. 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Moss, Cat. No. ABST).
- 15 19. 10% SDS.

Procedure:

1. Coat Corning 96-well ELISA plates with 2 μg of polyEY peptide in sterile PBS as described in step 3 of Materials and Reagents.
- 20 2. Remove unbound liquid from wells by inverting plate. Wash once with TBST. Pat the plate on a paper towel to remove excess liquid.
3. Add 100 μl of 1% BSA in PBS to each well. Incubate, with shaking, for 1 hr. at room temperature.
4. Repeat step 2.
- 25 5. Soak wells with 50 mM HEPES (pH7.5) (150 μl /well).
6. Dilute test compound with dH_2O /4% DMSO to 4 times the desired final assay concentration in 96-well polypropylene plates.
7. Add 25 μl diluted test compound to ELISA plate. In control wells, place 25 μl of dH_2O /4% DMSO.
- 30 8. Add 25 μl of 40 mM MnCl_2 with 4x ATP (2 μM) to each well.
9. Add 25 μl 0.5M EDTA to negative control wells.
10. Dilute GST-Flk1 to 0.005 μg (5 ng)/well with KDB.
11. Add 50 μl of diluted enzyme to each well.
12. Incubate, with shaking, for 15 minutes at room temperature.

93

13. Stop reaction by adding 50 μ l of 250 mM EDTA (pH 8.0).
14. Wash 3X with TBST and pat plate on paper towel to remove excess liquid.
15. Add 100 μ l per well anti-phosphotyrosine HRP conjugate, 1:5,000 dilution in antibody dilution buffer. Incubate, with shaking, for 90 min. at room temperature.
16. Wash as in step 14.
17. Add 100 μ l of room temperature ABTS solution to each well.
18. Incubate, with shaking, for 10 to 15 minutes. Remove any bubbles.
19. Stop reaction by adding 20 μ l of 10% SDS to each well.
20. Read results on Dynatech MR7000 ELISA reader with test filter at 410 nM and reference filter at 630 nM.

PYK2 BIOASSAY

This assay is used to measure the *in vitro* kinase activity of HA epitope-tagged full length pyk2 (FL.pyk2-HA) in an ELISA assay.

15 Materials and reagents:

1. Corning 96-well Elisa plates.
2. 12CA5 monoclonal anti-HA antibody (SUGEN, Inc.)
3. PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Gibco Catalog # 450-1300EB)
4. TBST Buffer: for 1 L, mix 8.766 g NaCl, 6.057 g TRIS and 1 ml of 0.1% Triton X-100 in approx. 900 ml dH₂O. Adjust pH to 7.2, bring volume to 1 L.
5. Blocking Buffer: for 1 L, mix 100 g 10% BSA, 12.1 g 100 mM TRIS, 58.44 g 1M NaCl and 10 mL of 1% TWEEN-20.
6. FL.pyk2-HA from sf9 cell lysates (SUGEN, Inc.).
7. 4% DMSO in MilliQue H₂O.
8. 10 mM ATP in dH₂O.
9. 1M MnCl₂.
10. 1M MgCl₂.
11. 1M Dithiothreitol (DTT).
12. 10X Kinase buffer phosphorylation: mix 5.0 ml 1M Hepes (pH 7.5), 0.2 ml 1M MnCl₂, 1.0 ml 1 M MgCl₂, 1.0 ml 10% Triton X-100 in 2.8 ml dH₂O. Just prior to use, add 0.1 ml 1M DTT.
13. NUNC 96-well V bottom polypropylene plates.
14. 500 mM EDTA in dH₂O.

15. Antibody dilution buffer: for 100 mL, 1 mL 5% BSA/PBS and 1 mL 10% Tween-20 in 88 mL TBS.
16. HRP-conjugated anti-Ptyr PY99), Santa Cruz Biotech Cat. No. SC-7020.
17. ABTS, Moss, Cat. No. ABST-2000.
- 5 18. 10% SDS.

Procedure:

1. Coat Corning 96 well ELISA plates with 0.5 µg per well 12CA5 anti-HA antibody in 100 µl PBS. Store overnight at 4°C.
- 10 2. Remove unbound HA antibody from wells by inverting plate. Wash plate with dH₂O. Pat the plate on a paper towel to remove excess liquid.
3. Add 150 µl Blocking Buffer to each well. Incubate, with shaking, for 30 min at room temperature.
4. Wash plate 4x with TBS-T.
5. Dilute lysate in PBS (1.5 µg lysate/100 µl PBS).
- 15 6. Add 100 µl of diluted lysate to each well. Shake at room temperature for 1 hr.
7. Wash as in step 4.
8. Add 50 µl of 2X kinase Buffer to ELISA plate containing captured pyk2-HA.
9. Add 25 µL of 400 µM test compound in 4% DMSO to each well. For control wells use 4% DMSO alone.
- 20 10. Add 25 µL of 0.5 M EDTA to negative control wells.
11. Add 25 µl of 20 µM ATP to all wells. Incubate, with shaking, for 10 minutes.
12. Stop reaction by adding 25 µl 500 mM EDTA (pH 8.0) to all wells.
13. Wash as in step 4.
14. Add 100 µL HRP conjugated anti-Ptyr diluted 1:6000 in Antibody Dilution
- 25 Buffer to each well. Incubate, with shaking, for 1 hr. at room temperature.
15. Wash plate 3X with TBST and 1X with PBS.
16. Add 100 µL of ABST solution to each well.
17. If necessary, stop the development reaction by adding 20 µL 10% SDS to each well.
- 30 18. Read plate on ELISA reader with test filter at 410 nM and reference filter at 630 nM.

FGFR1 BIOASSAY

This assay is used to measure the *in vitro* kinase activity of FGF1-R in an ELISA assay.

94

Materials and Reagents:

1. Costar 96-well Elisa plates (Corning Catalog # 3369).
2. Poly(Glu-Tyr) (Sigma Catalog # PO275).
3. PBS (Gibco Catalog # 450-1300EB)
- 5 4. 50 mM Hepes Buffer Solution.
5. Blocking Buffer (5% BSA/PBS).
6. Purified GST-FGFR1 (SUGEN, Inc.)
7. Kinase Dilution Buffer.
Mix 500 μ l 1M Hepes (GIBCO), 20 μ l 5% BSA/PBS, 10 μ l 100mM sodium
10 orthovanadate and 50 μ l 5M NaCl.
8. 10mM ATP
9. ATP/MnCl₂ phosphorylation mix: mix 20 μ L ATP, 400 μ L 1M MnCl₂ and 9.56
ml dH₂O.
10. NUNC 96-well V bottom polypropylene plates (Applied Scientific Catalog #
15 AS-72092).
11. 0.5M EDTA.
12. 0.05% TBST
Add 500 μ L TWEEN to 1 liter TBS.
13. Rabbit polyclonal anti-phosphotyrosine serum (SUGEN, Inc.).
- 20 14. Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Biosource, Catalog # ALI0404).
15. ABTS Solution.
16. ABTS/H₂O₂ solution.

Procedure:

1. Coat Costar 96 well ELISA plates with 1 μ g per well Poly(Glu,Tyr) in 100 μ l
25 PBS. Store overnight at 4° C.
2. Wash coated plates once with PBS.
3. Add 150 μ L of 5%BSA/PBS Blocking Buffer to each well. Incubate, with
shaking, for 1 hr.room temperature.
4. Wash plate 2x with PBS, then once with 50mM Hepes. Pat plates on a paper
30 towel to remove excess liquid and bubbles.
5. Add 25 μ L of 0.4 mM test compound in 4% DMSO or 4% DMSO alone
(controls) to plate.
6. Dilute purified GST-FGFR1 in Kinase Dilution Buffer (5 ng kinase/50ul
KDB/well).

7. Add 50 μ L of diluted kinase to each well.
8. Start kinase reaction by adding 25 μ L/well of freshly prepared ATP/Mn⁺⁺ (0.4 ml 1M MnCl₂, 40 μ L 10 mM ATP, 9.56 ml dH₂O), freshly prepared).
9. This is a fast kinase reaction and must be stopped with 25 μ L of 0.5M EDTA in a manner similar to the addition of ATP.
10. Wash plate 4x with fresh TBST.
11. Make up Antibody Dilution Buffer: Per 50 ml:
Mix 5 ml of 5% BSA, 250 μ L of 5% milk and 50 μ L of 100mM sodium vanadate, bring to final volume with 0.05% TBST.
12. Add 100 μ L per well of anti-phosphotyrosine (1:10000 dilution in ADB).
Incubate, with shaking for 1 hr. at room temperature.
13. Wash as in step 10.
14. Add 100 μ L per well of Biosource Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (1:6000 dilution in ADB). Incubate, with shaking for 1 hr. at room temperature.
15. Wash as in step 10 and then with PBS to remove bubbles and excess TWEEN.
16. Add 100 μ L of ABTS/H₂O₂ solution to each well.
17. Incubate, with shaking, for 10 to 20 minutes. Remove any bubbles.
18. Read assay on Dynatech MR7000 elisa reader: test filter at 410 nM, reference filtrate 630 nM.

20 EGFR BIOASSAY

This assay is used to the *in vitro* kinase activity of FGF1-R in an ELISA assay.

Materials and Reagents:

1. Corning 96-well Elisa plates.
2. SUMO1 monoclonal anti-EGFR antibody (SUGEN, Inc.).
- 25 3. PBS
4. TBST Buffer
5. Blocking Buffer: for 100 ml, mix 5.0 g Carnation Instant Non-fat Milk® with 100 ml of PBS.
6. A431 cell lysate (SUGEN, Inc.).
- 30 7. TBS Buffer:
8. TBS + 10% DMSO: for 1L, mix 1.514 g TRIS, 2.192 g NaCl and 25 ml DMSO; bring to 1 liter total volume with dH₂O.
9. ATP (Adenosine-5'-triphosphate, from Equine muscle, Sigma Cat. No. A-5394), 1.0 mM solution in dH₂O. This reagent should be made up immediately prior to

95

use and kept on ice.

10. 1.0 mM MnCl_2 .
11. ATP/ MnCl_2 phosphorylation mix: to make 10 ml, mix 300 μl of 1 mM ATP, 500 μl MnCl_2 and 9.2 ml dH_2O . Prepare just prior to use, keep on ice.
- 5 12. NUNC 96-well V bottom polypropylene plates.
13. EDTA.
14. Rabbit polyclonal anti-phosphotyrosine serum (SUGEN, Inc.).
15. Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Biosource Cat. No. ALI0404).
16. ABTS.
- 10 17. 30% Hydrogen peroxide.
18. ABTS/ H_2O_2 .
19. 0.2 M HCl.

Procedure:

1. Coat Corning 96 well ELISA plates with 0.5 μg SUMO1 in 100 μl PBS per well, store overnight at 4° C.
- 15 2. Remove unbound SUMO1 from wells by inverting plate to remove liquid. Wash 1x with dH_2O . Pat the plate on a paper towel to remove excess liquid.
3. Add 150 μl of Blocking Buffer to each well. Incubate, with shaking, for 30 min. at room temperature.
- 20 4. Wash plate 3x with deionized water, then once with TBST. Pat plate on a paper towel to remove excess liquid and bubbles.
5. Dilute lysate in PBS (7 μg lysate/100 μl PBS).
6. Add 100 μl of diluted lysate to each well. Shake at room temperature for 1 hr.
7. Wash plates as in 4, above.
- 25 8. Add 120 μl TBS to ELISA plate containing captured EGFR.
9. Dilute test compound 1:10 in TBS, place in well
10. Add 13.5 μl diluted test compound to ELISA plate. To control wells, add 13.5 μl TBS in 10% DMSO.
11. Incubate, with shaking, for 30 minutes at room temperature.
- 30 12. Add 15 μl phosphorylation mix to all wells except negative control well. Final well volume should be approximately 150 μl with 3 μM ATP/5 mM MnCl_2 final concentration in each well. Incubate with shaking for 5 minutes.
13. Stop reaction by adding 16.5 μl of EDTA solution while shaking. Shake for additional 1 min.

14. Wash 4x with deionized water, 2x with TBST.
15. Add 100 μ l anti-phosphotyrosine (1:3000 dilution in TBST) per well. Incubate, with shaking, for 30-45 min. at room temperature.
16. Wash as in 4, above.
- 5 17. Add 100 μ l Biosource Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (1:2000 dilution in TBST) to each well. Incubate with shaking for 30 min. at room temperature.
18. Wash as in 4, above.
19. Add 100 μ l of ABTS/ H_2O_2 solution to each well.
- 10 20. Incubate 5 to 10 minutes with shaking. Remove any bubbles.
21. If necessary, stop reaction by adding 100 μ l 0.2 M HCl per well.
22. Read assay on Dynatech MR7000 ELISA reader: test filter at 410 nM, reference filter at 630 nM.

PDGFR BIOASSAY

- 15 This assay is used to the *in vitro* kinase activity of FGF1-R in an ELISA assay.

Materials and Reagents:

1. Corning 96-well Elisa plates
2. 28D4C10 monoclonal anti-PDGFR antibody (SUGEN, Inc.).
3. PBS.
- 20 4. TBST Buffer.
5. Blocking Buffer (same as for EGFR bioassay).
6. PDGFR- β expressing NIH 3T3 cell lysate (SUGEN, Inc.).
7. TBS Buffer.
8. TBS + 10% DMSO.
- 25 9. ATP.
10. $MnCl_2$.
11. Kinase buffer phosphorylation mix: for 10 ml, mix 250 μ l 1M TRIS, 200 μ l 5M NaCl, 100 μ l 1M $MnCl_2$ and 50 μ l 100 mM Triton X-100 in enough dH_2O to make 10 ml.
- 30 12. NUNC 96-well V bottom polypropylene plates.
13. EDTA.
14. Rabbit polyclonal anti-phosphotyrosine serum (SUGEN, Inc.).
15. Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Biosource Cat. No. ALI0404).
16. ABTS.

96

17. Hydrogen peroxide, 30% solution.
18. ABTS/H₂O₂.
19. 0.2 M HCl.

Procedure:

- | | |
|----|--|
| 5 | 1. Coat Corning 96 well ELISA plates with 0.5 µg 28D4C10 in 100 µl PBS per well, store overnight at 4° C. |
| | 2. Remove unbound 28D4C10 from wells by inverting plate to remove liquid. Wash 1x with dH ₂ O. Pat the plate on a paper towel to remove excess liquid. |
| 10 | 3. Add 150 µl of Blocking Buffer to each well. Incubate for 30 min. at room temperature with shaking. |
| | 4. Wash plate 3x with deionized water, then once with TBST. Pat plate on a paper towel to remove excess liquid and bubbles. |
| | 5. Dilute lysate in HNTG (10 µg lysate/100 µl HNTG). |
| 15 | 6. Add 100 µl of diluted lysate to each well. Shake at room temperature for 60 min. |
| | 7. Wash plates as described in Step 4. |
| | 8. Add 80 µl working kinase buffer mix to ELISA plate containing captured PDGFR. |
| | 9. Dilute test compound 1:10 in TBS in 96-well polypropylene plates. |
| 20 | 10. Add 10 µl diluted test compound to ELISA plate. To control wells, add 10 µl TBS + 10% DMSO. Incubate with shaking for 30 minutes at room temperature. |
| | 11. Add 10 µl ATP directly to all wells except negative control well (final well volume should be approximately 100 µl with 20 µM ATP in each well.) Incubate 30 minutes with shaking. |
| 25 | 12. Stop reaction by adding 10 µl of EDTA solution to each well. |
| | 13. Wash 4x with deionized water, twice with TBST. |
| | 14. Add 100 µl anti-phosphotyrosine (1:3000 dilution in TBST) per well. Incubate with shaking for 30-45 min. at room temperature. |
| | 15. Wash as in Step 4. |
| 30 | 16. Add 100 µl Biosource Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (1:2000 dilution in TBST) to each well. Incubate with shaking for 30 min. at room temperature. |
| | 17. Wash as in Step 4. |
| | 18. Add 100 µl of ABTS/H ₂ O ₂ solution to each well. |

19. Incubate 10 to 30 minutes with shaking. Remove any bubbles.
20. If necessary stop reaction with the addition of 100 µl 0.2 M HCl per well.
21. Read assay on Dynatech MR7000 ELISA reader with test filter at 410 nM and reference filter at 630 nM.

5 CELLULAR HER-2 KINASE ASSAY

This assay is used to measure HER-2 kinase activity in whole cells in an ELISA format.

Materials and Reagents:

1. DMEM (GIBCO Catalog #11965-092).
2. Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO Catalog #16000-044), heat inactivated in a
10 water bath for 30 min. at 56° C
3. Trypsin (GIBCO Catalog #25200-056).
4. L-Glutamine (GIBCO Catalog #25030-081)
5. HEPES (GIBCO Catalog #15630-080).
6. Growth Media
15 Mix 500 ml DMEM, 55 ml heat inactivated FBS, 10 ml HEPES and 5.5 ml L-Glutamine.
7. Starve Media
Mix 500 ml DMEM, 2.5 ml heat inactivated FBS, 10 ml HEPES and 5.5 ml L-Glutamine.
8. PBS.
20
9. Flat Bottom 96-well Tissue Culture Micro Titer Plates (Corning Catalog # 25860).
10. 15 cm Tissue Culture Dishes (Corning Catalog #08757148).
11. Corning 96-well ELISA Plates.
12. NUNC 96-well V bottom polypropylene plates.
25
13. Costar Transfer Cartridges for the Transtar 96 (Costar Catalog #7610).
14. SUMO 1: monoclonal anti-EGFR antibody (SUGEN, Inc.).
15. TBST Buffer.
16. Blocking Buffer : 5% Carnation Instant Milk® in PBS.
17. EGF Ligand: EGF-201, Shinko American, Japan. Suspend powder in 100 uL of
30 10mM HCl. Add 100uL 10mM NaOH. Add 800 uL PBS and transfer to an Eppendorf tube, store at -20°C until ready to use.
18. HNTG Lysis Buffer

97

For Stock 5X HNTG, mix 23.83 g Hepes, 43.83 g NaCl, 500 ml glycerol and 100 ml Triton X-100 and enough dH₂O to make 1 L of total solution.

For 1X HNTG*, mix 2 ml HNTG, 100 μ L 0.1M Na₃VO₄, 250 μ L 0.2M Na₄P₂O₇ and 100 μ L EDTA.

- 5 19. EDTA.
20. Na₃VO₄. To make stock solution, mix 1.84 g Na₃VO₄ with 90 ml dH₂O. Adjust pH to 10. Boil in microwave for one minute (solution becomes clear). Cool to room temperature. Adjust pH to 10. Repeat heating/cooling cycle until pH remains at 10.
- 10 21. 200 mM Na₄P₂O₇.
22. Rabbit polyclonal antiserum specific for phosphotyrosine (anti-Ptyr antibody, SUGEN, Inc.).
23. Affinity purified antiserum, goat anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugate (Biosource Cat # ALI0404).
- 15 24. ABTS Solution.
25. 30 % Hydrogen peroxide solution.
26. ABTS/H₂O₂.
27. 0.2 M HCl.

Procedure:

- 20 1. Coat Corning 96 well ELISA plates with SUMO1 at 1.0 ug per well in PBS, 100 ul final volume/well. Store overnight at 4°C.
2. On day of use, remove coating buffer and wash plate 3 times with dH₂O and once with TBST buffer. All washes in this assay should be done in this manner, unless otherwise specified.
- 25 3. Add 100 ul of Blocking Buffer to each well. Incubate plate, with shaking, for 30 min. at room temperature. Just prior to use, wash plate.
4. Use EGF α /HER-2 chimera/3T3-C7 cell line for this assay.
5. Choose dishes having 80-90 % confluence. Collect cells by trypsinization and centrifuge at 1000 rpm at room temperature for 5 min.
- 30 6. Resuspend cells in starve medium and count with trypan blue. Viability above 90% is required. Seed cells in starve medium at a density of 2,500 cells per well, 90 ul per well, in a 96 well microtiter plate. Incubate seeded cells overnight at 37° under 5% CO₂.
7. Start the assay two days after seeding.

8. Test compounds are dissolved in 4% DMSO. Samples are then further diluted directly on plates with starve-DMEM. Typically, this dilution will be 1:10 or greater. All wells are then transferred to the cell plate at a further 1:10 dilution (10µl sample and media into 90 µl of starve media. The final DMSO concentration should be 1% or lower. A standard serial dilution may also be used.
9. Incubate under 5% CO₂ at 37°C for 2 hours.
10. Prepare EGF ligand by diluting stock EGF (16.5 µM) in warm DMEM to 150 nM.
11. Prepare fresh HNTG* sufficient for 100 ul per well; place on ice.
12. After 2 hour incubation with test compound, add prepared EGF ligand to cells, 50 ul per well, for a final concentration of 50 nM. Positive control wells receive the same amount of EGF. Negative controls do not receive EGF. Incubate at 37° C for 10 min.
13. Remove test compound, EGF, and DMEM. Wash cells once with PBS.
14. Transfer HNTG* to cells, 100 ul per well. Place on ice for 5 minutes. Meanwhile, remove blocking buffer from ELISA plate and wash.
15. Scrape cells from plate with a micropipettor and homogenize cell material by repeatedly aspirating and dispensing the HNTG* lysis buffer. Transfer lysate to a coated, blocked, washed ELISA plate. Or, use a Costar transfer cartridge to transfer lysate to the plate.
16. Incubate, with shaking, at room temperature for 1 hr.
17. Remove lysate, wash. Transfer freshly diluted anti-Ptyr antibody (1:3000 in TBST) to ELISA plate, 100 ul per well.
18. Incubate, with shaking, at room temperature, for 30 min.
19. Remove anti-Ptyr antibody, wash. Transfer freshly diluted BIOSOURCE antibody to ELISA plate(1:8000 in TBST, 100 ul per well).
20. Incubate, with shaking, at room temperature for 30 min.
21. Remove BIOSOURCE antibody, wash. Transfer freshly prepared ABTS/H₂O₂ solution to ELISA plate, 100 ul per well.
22. Incubate, with shaking, for 5-10 minutes. Remove any bubbles.
23. Stop reaction with the addition of 100ul of 0.2M HCl per well.
24. Read assay on Dynatech MR7000 ELISA reader with test filter set at 410 nM and reference filter at 630 nM.

98

CDK2/CYCLIN A ASSAY

This assay is used to measure the *in vitro* serine/threonine kinase activity of human cdk2/cyclin A in a Scintillation Proximity Assay (SPA).

Materials and Reagents.

- 5 1. Wallac 96-well polyethylene terephthalate (flexi) plates (Wallac Catalog # 1450-401).
2. Amersham Redivue [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (Amersham catalog #AH 9968).
3. Amersham streptavidin coated polyvinyltoluene SPA beads (Amersham catalog #RPNQ0007). The beads should be reconstituted in PBS without magnesium or
- 10 calcium, at 20 mg/ml.
4. Activated cdk2/cyclin A enzyme complex purified from Sf9 cells (SUGEN, Inc.).
5. Biotinylated peptide substrate (Debtide). Peptide biotin-X-PKTPKKAKKL is dissolved in dH₂O at a concentration of 5 mg/ml.
- 15 6. Peptide/ATP Mixture: for 10 ml, mix 9.979 ml dH₂O, 0.00125 ml "cold" ATP, 0.010 ml Debtide and 0.010 ml $\gamma^{33}\text{P}$ ATP. The ultimate concentration per well will be 0.5 μM "cold" ATP, 0.1 μg Debtide and 0.2 μCi $\gamma^{33}\text{P}$ ATP.
7. Kinase buffer: for 10 ml, mix 8.85 ml dH₂O, 0.625 ml TRIS(pH 7.4), 0.25 ml 1M MgCl₂, 0.25 ml 10% NP40 and 0.025 ml 1M DTT, added fresh just prior to
- 20 use.
8. 10 mM ATP in dH₂O.
9. 1M Tris, pH adjusted to 7.4 with HCl.
10. 1M MgCl₂.
11. 1M DTT.
- 25 12. PBS (Gibco Catalog # 14190-144).
13. 0.5M EDTA.
14. Stop solution: For 10 ml, mix 9.25 ml PBS, 0.005 ml 100 mM ATP, 0.1 ml 0.5 M EDTA, 0.1 ml 10% Triton X-100 and 1.25 ml of 20 mg/ml SPA beads.

Procedure:

- 30 1. Prepare solutions of test compounds at 5x the desired final concentration in 5% DMSO. Add 10 μl to each well. For negative controls, use 10 μl 5% DMSO alone in wells.
2. Dilute 5 μl of cdk2/cyclin A solution with 2.1 ml 2x kinase buffer.
3. Add 20 μl enzyme to each well.

4. Add 10 μ L of 0.5 M EDTA to the negative control wells.
5. To start kinase reaction, add 20 μ L of peptide/ATP mixture to each well.
Incubate for 1 hr. without shaking.
6. Add 200 μ l stop solution to each well.
- 5 7. Hold at least 10 min.
8. Spin plate at approx. 2300 rpm for 3-5 min.
9. Count plate using Trilux or similar reader.

MET TRANSPHOSPHORYLATION ASSAY

- 10 This assay is used to measure phosphotyrosine levels on a poly(glutamic acid:tyrosine (4:1)) substrate as a means for identifying agonists/antagonists of met transphosphorylation of the substrate.

Materials and Reagents:

- 15 1. Corning 96-well Elisa plates, Corning Catalog # 25805-96.
2. Poly(glu, tyr) 4:1, Sigma, Cat. No; P 0275.
3. PBS, Gibco Catalog # 450-1300EB
4. 50 mM HEPES
5. Blocking Buffer: Dissolve 25 g Bovine Serum Albumin, Sigma Cat. No A-7888, in 500 ml PBS, filter through a 4 μ m filter.
- 20 6. Purified GST fusion protein containing the Met kinase domain, Sugen, Inc.
7. TBST Buffer.
8. 10% aqueous (MilliQue H₂O) DMSO.
9. 10 mM aqueous (dH₂O) Adenosine-5'-triphosphate, Sigma Cat. No. A-5394.
- 25 10. 2X Kinase Dilution Buffer: for 100 ml, mix 10 mL 1M HEPES at pH 7.5 with 0.4 mL 5% BSA/PBS, 0.2 mL 0.1 M sodium orthovanadate and 1 mL 5M sodium chloride in 88.4 mL dH₂O.
11. 4X ATP Reaction Mixture: for 10 mL, mix 0.4 mL 1 M manganese chloride and 0.02 mL 0.1 M ATP in 9.56 mL dH₂O.
- 30 12. 4X Negative Controls Mixture: for 10 mL, mix 0.4 mL 1 M manganese chloride in 9.6 mL dH₂O.
13. NUNC 96-well V bottom polypropylene plates, Applied Scientific Catalog # S-72092
14. 500 mM EDTA.

15. Antibody Dilution Buffer: for 100 mL, mix 10 mL 5% BSA/PBS, 0.5 mL 5% Carnation Instant Milk® in PBS and 0.1 mL 0.1 M sodium orthovanadate in 88.4 mL TBST.
16. Rabbit polyclonal antophosphotyrosine antibody, Sugen, Inc.
- 5 17. Goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated antibody, Biosource, Inc.
18. ABTS Solution: for 1 L, mix 19.21 g citric acid, 35.49 g Na₂HPO₄ and 500 mg ABTS with sufficient dH₂O to make 1 L.
19. ABTS/H₂O₂: mix 15 mL ABST solution with 2 µL H₂O₂ five minutes before use.
- 10 20. 0.2 M HCl

Procedure:

1. Coat ELISA plates with 2 µg Poly(Glu-Tyr) in 100 µL PBS, store overnight at 4 ° C.
2. Block plate with 150 µL of 5% BSA / PBS for 60 min.
- 15 3. Wash plate twice with PBS, once with 50 mM Hepes buffer pH 7.4.
4. Add 50 µl of the diluted kinase to all wells. (Purified kinase is diluted with Kinase Dilution Buffer. Final concentration should be 10 ng/well.)
5. Add 25 µL of the test compound (in 4% DMSO) or DMSO alone (4% in dH₂O) for controls to plate.
- 20 6. Incubate the kinase/compound mixture for 15 minutes.
7. Add 25 µL of 40 mM MnCl₂ to the negative control wells.
8. Add 25 µL ATP/ MnCl₂ mixture to the all other wells (except the negative controls). Incubate for 5 min.
9. Add 25 µL 500 mM EDTA to stop reaction.
- 25 10. Wash plate 3x with TBST.
11. Add 100 µL rabbit polyclonal anti-Ptyr diluted 1:10,000 in Antibody Dilution Buffer to each well. Incubate, with shaking, at room temperature for one hour.
12. Wash plate 3x with TBST.
13. Dilute Biosource HRP conjugated anti-rabbit antibody 1: 6,000 in Antibody Dilution buffer. Add 100 µL per well and incubate at room temperature, with shaking, for one hour.
- 30 14. Wash plate 1X with PBS.
15. Add 100 µl of ABTS/H₂O₂ solution to each well.

16. If necessary, stop the development reaction with the addition of 100 μ l of 0.2M HCl per well.
17. Read plate on Dynatech MR7000 elisa reader with the test filter at 410 nM and the reference filter at 630 nM.

5 IGF-1 TRANSPHOSPHORYLATION ASSAY

This assay is used to measure the phosphotyrosine level in poly(glutamic acid:tyrosine)(4:1) for the identification of agonists/antagonists of *gst*-IGF-1 transphosphorylation of a substrate.

Materials and Reagents:

1. Corning 96-well Elisa plates.
- 10 2. Poly (Glu-tyr) (4:1), Sigma Cat. No. P 0275.
3. PBS, Gibco Catalog # 450-1300EB.
4. 50 mM HEPES
5. TBB Blocking Buffer: for 1 L, mix 100 g BSA, 12.1 g TRIS (pH 7.5), 58.44 g sodium chloride and 10 mL 1%TWEEN-20.
- 15 6. Purified GST fusion protein containing the IGF-1 kinase domain (Sugen, Inc.)
7. TBST Buffer: for 1 L, mix 6.057 g Tris, 8.766 g sodium chloride and 0.5 ml TWEEN-20 with enough dH₂O to make 1 liter.
8. 4% DMSO in Milli-Q H₂O.
9. 10 mM ATP in dH₂O.
- 20 10. 2X Kinase Dilution Buffer: for 100 mL, mix 10 mL 1 M HEPES (pH 7.5), 0.4 mL 5% BSA in dH₂O, 0.2 mL 0.1 M sodium orthovanadate and 1 mL 5 M sodium chloride with enough dH₂O to make 100 mL.
11. 4X ATP Reaction Mixture: for 10 mL, mix 0.4 mL 1 M MnCl₂ and 0.008 mL 0.01 M ATP and 9.56 mL dH₂O.
- 25 12. 4X Negative Controls Mixture: mix 0.4 mL 1 M manganese chloride in 9.60 mL dH₂O.
13. NUNC 96-well V bottom polypropylene plates.
14. 500 mM EDTA in dH₂O.
15. Antibody Dilution Buffer: for 100 mL, mix 10 mL 5% BSA in PBS, 0.5 mL 5% Carnation Instant Non-fat Milk® in PBS and 0.1 mL 0.1 M sodium orthovanadate in 88.4 mL TBST.
- 30 16. Rabbit Polyclonal antiphosphotyrosine antibody, Sugan, Inc.
17. Goat anti-rabbit HRP conjugated antibody, Biosource.
18. ABTS Solution.

100

20. ABTS/H₂O₂: mix 15 mL ABTS with 2 µL H₂O₂ 5 minutes before using.
21. 0.2 M HCl in dH₂O.

Procedure:

- 5 1. Coat ELISA plate with 2.0 µg / well Poly(Glu, Tyr) 4:1 (Sigma P0275) in 100 µl PBS. Store plate overnight at 4° C.
2. Wash plate once with PBS.
3. Add 100 µl of TBB Blocking Buffer to each well. Incubate plate for 1 hour with shaking at room temperature.
4. Wash plate once with PBS, then twice with 50 mM Hepes buffer pH 7.5.
- 10 5. Add 25 µL of test compound in 4% DMSO (obtained by diluting a stock solution of 10 mM test compound in 100% DMSO with dH₂O) to plate.
6. Add 10.0 ng of gst-IGF-1 kinase in 50 µl Kinase Dilution Buffer) to all wells.
7. Start kinase reaction by adding 25µl 4X ATP Reaction Mixture to all test wells and positive control wells. Add 25µl 4X Negative Controls Mixture to all negative control wells. Incubates for 10 minutes with shaking at room temperature.
- 15 8. Add 25µl 0.5M EDTA (pH 8.0) to all wells.
9. Wash plate 4x with TBST Buffer.
10. Add rabbit polyclonal anti-phosphotyrosine antisera at a dilution of 1:10,000 in 100µl Antibody Dilution Buffer to all wells. Incubate, with shaking, at room temperature for 1 hour.
- 20 11. Wash plate as in step 9.
12. Add 100 µL Biosource anti-rabbit HRP at a dilution of 1:10,000 in Antibody dilution buffer to all wells. Incubate, with shaking, at room temperature for 1 hour.
- 25 13. Wash plate as in step 9, follow with one wash with PBS to reduce bubbles and excess Tween-20.
14. Develop by adding 100µl/well ABTS/H₂O₂ to each well.
- 30 15. After about 5 minutes, read on ELISA reader with test filter at 410 nm and referenced filter at 630 nm.

BRDU INCORPORATION ASSAYS

The following assays use cells engineered to express a selected receptor and then evaluate the effect of a compound of interest on the activity of ligand-induced DNA synthesis by determining BrdU incorporation into the DNA.

The following materials, reagents and procedure are general to each of the following BrdU incorporation assays. Variances in specific assays are noted.

Materials and Reagents:

1. The appropriate ligand.
- 5 2. The appropriate engineered cells.
3. BrdU Labeling Reagent: 10 mM, in PBS (pH 7.4)(Boehringer Mannheim, Germany).
4. FixDenat: fixation solution (ready to use)(Boehringer Mannheim, Germany).
5. Anti-BrdU-POD: mouse monoclonal antibody conjugated with peroxidase (Boehringer Mannheim, Germany).
- 10 6. TMB Substrate Solution: tetramethylbenzidine (TMB, Boehringer Mannheim, Germany).
7. PBS Washing Solution : 1X PBS, pH 7.4.
8. Albumin, Bovine (BSA), fraction V powder (Sigma Chemical Co., USA).

General Procedure:

- 15 1. Cells are seeded at 8000 cells/well in 10% CS, 2 mM Gln in DMEM, in a 96 well plate. Cells are incubated overnight at 37°C in 5% CO₂.
2. After 24 hours, the cells are washed with PBS, and then are serum-starved in serum free medium (0% CS DMEM with 0.1% BSA) for 24 hours.
- 20 3. On day 3, the appropriate ligand and the test compound are added to the cells simultaneously. The negative control wells receive serum free DMEM with 0.1% BSA only; the positive control cells receive the ligand but no test compound. Test compounds are prepared in serum free DMEM with ligand in a 96 well plate, and serially diluted for 7 test concentrations.
- 25 4. After 18 hours of ligand activation, diluted BrdU labeling reagent (1:100 in DMEM, 0.1% BSA) is added and the cells are incubated with BrdU (final concentration=10 µM) for 1.5 hours.
5. After incubation with labeling reagent, the medium is removed by decanting and tapping the inverted plate on a paper towel. FixDenat solution is added (50 µl/well) and the plates are incubated at room temperature for 45 minutes on a plate shaker.
- 30 6. The FixDenat solution is thoroughly removed by decanting and tapping the inverted plate on a paper towel. Milk is added (5% dehydrated milk in PBS, 200 µl/well) as a blocking solution and the plate is incubated for 30 minutes at room temperature on a plate shaker.

101

7. The blocking solution is removed by decanting and the wells are washed once with PBS. Anti-BrdU-POD solution (1:200 dilution in PBS, 1% BSA) is added (50 μ l/well) and the plate is incubated for 90 minutes at room temperature on a plate shaker.
- 5 8. The antibody conjugate is thoroughly removed by decanting and rinsing the wells 5 times with PBS, and the plate is dried by inverting and tapping on a paper towel.
9. TMB substrate solution is added (100 μ l/well) and incubated for 20 minutes at room temperature on a plate shaker until color development is sufficient for photometric detection.
- 10 10. The absorbance of the samples are measured at 410 nm (in "dual wavelength" mode with a filter reading at 490 nm, as a reference wavelength) on a Dynatech ELISA plate reader.

EGF-Induced BrdU Incorporation Assay**15 Materials and Reagents:**

1. Mouse EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFRc7.

EGF-Induced Her-2-driven BrdU Incorporation Assay**Materials and Reagents:**

- 20 1. Mouse EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr with a Her-2 kinase domain).

EGF-Induced Her-4-driven BrdU Incorporation Assay**Materials and Reagents:**

- 25 1. Mouse EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr (EGFr with a Her-4 kinase domain).

PDGF-Induced BrdU Incorporation Assay**Materials and Reagents:**

1. Human PDGF B/B (Boehringer Mannheim, Germany).
2. 3T3/EGFRc7.

30 FGF-Induced BrdU Incorporation Assay**Materials and Reagents:**

1. Human FGF2/bFGF (Gibco BRL, USA).
2. 3T3c7/EGFr

IGF1-Induced BrdU Incorporation Assay**Materials and Reagents:**

1. Human, recombinant (G511, Promega Corp., USA)
2. 3T3/IGF1r.

5 Insulin-Induced BrdU Incorporation Assay**Materials and Reagents:**

1. Insulin, crystalline, bovine, Zinc (13007, Gibco BRL, USA).
2. 3T3/H25.

HGF-Induced BrdU Incorporation Assay**10 Materials and Reagents:**

1. Recombinant human HGF (Cat. No. 249-HG, R&D Systems, Inc. USA).
2. BxPC-3 cells (ATCC CRL-1687).

Procedure:

1. Cells are seeded at 9000 cells/well in RPMI 10% FBS in a 96 well plate. Cells
15 are incubated overnight at 37°C in 5% CO₂.
2. After 24 hours, the cells are washed with PBS, and then are serum starved in
100 µl serum-free medium (RPMI with 0.1% BSA) for 24 hours.
3. On day 3, 25 µl containing ligand (prepared at 1 µg/ml in RPMI with 0.1%
BSA; final HGF conc. is 200 ng/ml) and test compounds are added to the cells.
20 The negative control wells receive 25 µl serum-free RPMI with 0.1% BSA
only; the positive control cells receive the ligand (HGF) but no test compound.
Test compounds are prepared at 5 times their final concentration in serum-free
RPMI with ligand in a 96 well plate, and serially diluted to give 7 test
concentrations. Typically, the highest final concentration of test compound is
25 100 µM, and 1:3 dilutions are used (i.e. final test compound concentration range
is 0.137-100 µM).
4. After 18 hours of ligand activation, 12.5 µl of diluted BrdU labeling reagent
(1:100 in RPMI, 0.1% BSA) is added to each well and the cells are incubated
with BrdU (final concentration is 10 µM) for 1 hour.
- 30 5. Same as General Procedure.
6. Same as General Procedure.
7. The blocking solution is removed by decanting and the wells are washed once
with PBS. Anti-BrdU-POD solution (1:100 dilution in PBS, 1% BSA) is added

102

(100 μ l/well) and the plate is incubated for 90 minutes at room temperature on a plate shaker.

8. Same as General Procedure.

9. Same as General Procedure.

5 10. Same as General Procedure.

HUV-EC-C Assay

This assay is used to measure a compound's activity against PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF or Flk-1/KDR, all of which are naturally expressed by HUV-EC cells.

DAY 0

- 10 1. Wash and trypsinize HUV-EC-C cells (human umbilical vein endothelial cells, (American Type Culture Collection, catalogue no. 1730 CRL). Wash with Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, obtained from Gibco BRL, catalogue no. 14190-029) 2 times at about 1 ml/10 cm^2 of tissue culture flask. Trypsinize with 0.05% trypsin-EDTA in non-enzymatic cell dissociation solution (Sigma Chemical Company, catalogue no. C-1544).
- 15 The 0.05% trypsin is made by diluting 0.25% trypsin/1 mM EDTA (Gibco, catalogue no. 25200-049) in the cell dissociation solution. Trypsinize with about 1 ml/25-30 cm^2 of tissue culture flask for about 5 minutes at 37°C. After cells have detached from the flask, add an equal volume of assay medium and transfer to a 50 ml sterile centrifuge tube (Fisher Scientific, catalogue no. 05-539-6).
- 20 2. Wash the cells with about 35 ml assay medium in the 50 ml sterile centrifuge tube by adding the assay medium, centrifuge for 10 minutes at approximately 200x g, aspirate the supernatant, and resuspend with 35 ml D-PBS. Repeat the wash two more times with D-PBS, resuspend the cells in about 1 ml assay medium/15 cm^2 of tissue culture flask. Assay medium consists of F12K medium (Gibco BRL, catalogue no. 21127-014) and 0.5% heat-
- 25 inactivated fetal bovine serum. Count the cells with a Coulter Counter® (Coulter Electronics, Inc.) and add assay medium to the cells to obtain a concentration of $0.8\text{--}1.0 \times 10^4$ cells/ml.
3. Add cells to 96-well flat-bottom plates at 100 μ l/well or $0.8\text{--}1.0 \times 10^4$ cells/well, incubate ~24h at 37°C, 5% CO_2 .

DAY 1

- 30 1. Make up two-fold test compound titrations in separate 96-well plates, generally 50 μ M on down to 0 μ M. Use the same assay medium as mentioned in day 0, step 2 above. Titrations are made by adding 90 μ l/well of test compound at 200 μ M (4X the final well concentration) to the top well of a particular plate column. Since the stock test compound is usually 20 mM in DMSO, the 200 μ M drug concentration contains 2% DMSO.

A diluent made up to 2% DMSO in assay medium (F12K + 0.5% fetal bovine serum) is used as diluent for the test compound titrations in order to dilute the test compound but keep the DMSO concentration constant. Add this diluent to the remaining wells in the column at 60 μ l/well. Take 60 μ l from the 120 μ l of 200 μ M test compound dilution in the top well of the column and mix with the 60 μ l in the second well of the column. Take 60 μ l from this well and mix with the 60 μ l in the third well of the column, and so on until two-fold titrations are completed. When the next-to-the-last well is mixed, take 60 μ l of the 120 μ l in this well and discard it. Leave the last well with 60 μ l of DMSO/media diluent as a non-test compound-containing control. Make 9 columns of titrated test compound, enough for triplicate wells each for: (1) VEGF (obtained from Pepro Tech Inc., catalogue no. 100-200, (2) endothelial cell growth factor (ECGF) (also known as acidic fibroblast growth factor, or aFGF) (obtained from Boehringer Mannheim Biochemica, catalogue no. 1439 600), or, (3) human PDGF B/B (1276-956, Boehringer Mannheim, Germany) and assay media control. ECGF comes as a preparation with sodium heparin.

2. Transfer 50 μ l/well of the test compound dilutions to the 96-well assay plates containing the $0.8-1.0 \times 10^4$ cells/100 μ l/well of the HUV-EC-C cells from day 0 and incubate ~2 h at 37° C, 5% CO₂.

3. In triplicate, add 50 μ l/well of 80 μ g/ml VEGF, 20 ng/ml ECGF, or media control to each test compound condition. As with the test compounds, the growth factor concentrations are 4X the desired final concentration. Use the assay media from day 0 step 2 to make the concentrations of growth factors. Incubate approximately 24 hours at 37°C, 5% CO₂. Each well will have 50 μ l test compound dilution, 50 μ l growth factor or media, and 100 μ l cells, which calculates to 200 μ l/well total. Thus the 4X concentrations of test compound and growth factors become 1X once everything has been added to the wells.

DAY 2

1. Add ³H-thymidine (Amersham, catalogue no. TRK-686) at 1 μ Ci/well (10 μ l/well of 100 μ Ci/ml solution made up in RPMI media + 10% heat-inactivated fetal bovine serum) and incubate ~24 h at 37°C, 5% CO₂. RPMI is obtained from Gibco BRL, catalogue no. 11875-051.

DAY 3

1. Freeze plates overnight at -20°C.

DAY 4

Thaw plates and harvest with a 96-well plate harvester (Tomtec Harvester 96[®]) onto filter mats (Wallac, catalogue no. 1205-401), read counts on a Wallac Betaplate™ liquid

103

scintillation counter.

TABLE 2 shows the results of biological testing of some exemplary compounds of Formula (I). The results are reported in terms of IC₅₀, the micromolar (μM) concentration of the compound being tested which causes a 50% change in the activity of the target PKT compared to the activity of the PTK in a control to which no test compound has been added. Specifically, the results shown indicate the concentration of a test compound needed to cause a 50% reduction of the activity of the target PTK. Bioassays which have been or can be used to evaluate compounds are described in detail below.

TABLE 2

Example	bio flkGST IC50 (μM)	bio FGFR1 IC50 (μM)	bio PDGF IC50 (μM)	bio EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Kinase IC50 (μM)	cdk2spa C50 (μM)	bio 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	20.08	5.5		
9	0.96		>100	>100	>100	16.38		
10	5.72		>100	94.04	15.86	8.06		
11	9.77		>100	>100	>100	>100		
12	>20		21.46	>100		27.73		
13	>20		81.92	8.17		2.66		
14	13.01		42.41	>100		66.02		
15	>20		>100	>100		98.61		
16	>20		98.06	>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		
21	7.18		>100	40.34		27.69		
22	>20		>100	>100		87.67		
23	>20		>100	36.64		4.05		
24			>100	16.84		5.31		
25	12.55		>100	23.48		7.9		
26	16.03		66.87	34.67		10.04		
27			>100	26.5		3.91		

Example	bio flkGST IC50 (μM)	bio FGFR1 IC50 (μM)	bio PDGF IC50 (μM)	bio EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Kinase IC50 (μM)	cdk2spa C50 (μM)	bio pyk2 IC50 (μM)
28	4.5		71.27	53.66		2.67		
29	10.12		>100	26.72		3.98		
30	9.4		>100	18.69		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		
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		
44	<0.05		0.02	20.73	67.46	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	0.006	0.3	<0.78	17.88	21.58	7.93		0.09
49			<0.78	>100	43.86	>100		
50			<0.78	>100	20.34	>100		
51	0.006	1.66	0.01	18.1	21.61	23.24	16.69	0.35
52	0.08	1.26	<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		
65	0.37		<0.05	>100	74.36	15.97		
66	<0.05			>100	11.84	2.76		
67	0.39		24.77	31.38	19.79	2.56		

102

Example	bio flkGST IC50 (μM)	bio FGFR1 IC50 (μM)	bio PDGF IC50 (μM)	bio EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Kinase IC50 (μM)	cdk2spa C50 (μM)	bio pyk2 IC50 (μM)
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		0.008
84	1.38		12.51	67.2		5.86		0.006
85	0.2	0.8	2.59	>100		3.76		
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	

IN VIVO ANIMAL MODELS

XENOGRAFT ANIMAL MODELS

5 The ability of human tumors to grow as xenografts in athymic mice (e.g., Balb/c, nu/nu) provides a useful *in vivo* model for studying the biological response to therapies for human tumors. Since the first successful xenotransplantation of human tumors into athymic mice, (Rygaard and Povlsen, 1969, Acta Pathol. Microbial. Scand. 77:758-760), many different human tumor cell lines (e.g., mammary, lung, genitourinary, gastro-intestinal, head and neck,

10 glioblastoma, bone, and malignant melanomas) have been transplanted and successfully grown

in nude mice. The following assays may be used to determine the level of activity, specificity and effect of the different compounds of Formula (I).

Three general types of assays are useful for evaluating compounds of Formula (I): cellular/catalytic, cellular/biological and *in vivo*. The object of the cellular/catalytic assays is to determine the effect of a compound of Formula (I) on the ability of a TK to phosphorylate tyrosines on a known substrate in a cell. The object of the cellular/biological assays is to determine the effect of a compound of Formula (I) on the biological response stimulated by a TK in a cell. The object of the *in vivo* assays is to determine the effect of a compound of Formula (I) in an animal model of a particular disorder such as cancer.

Suitable cell lines for subcutaneous xenograft experiments include C6 cells (glioma, ATCC # CCL 107), A375 cells (melanoma, ATCC # CRL 1619), A431 cells (epidermoid carcinoma, ATCC # CRL 1555), Calu 6 cells (lung, ATCC # HTB 56), PC3 cells (prostate, ATCC # CRL 1435), SKOV3TP5 cells and NIH 3T3 fibroblasts genetically engineered to overexpress EGFR, PDGFR, IGF-1R or any other test kinase. The following protocol can be used to perform xenograft experiments:

Female athymic mice (BALB/c, nu/nu) are obtained from Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). All animals are maintained under clean-room conditions in Micro-isolator cages with Alpha-dri bedding. They receive sterile rodent chow and water ad libitum.

Cell lines are grown in appropriate medium (for example, MEM, DMEM, Ham's F10, or Ham's F12 plus 5% - 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 mM glutamine (GLN)). All cell culture media, glutamine, and fetal bovine serum are purchased from Gibco Life Technologies (Grand Island, NY) unless otherwise specified. All cells are grown in a humid atmosphere of 90-95% air and 5-10% CO₂ at 37°C. All cell lines are routinely subcultured twice a week and are negative for mycoplasma as determined by the Mycotect method (Gibco).

Cells are harvested at or near confluency with 0.05% Trypsin-EDTA and pelleted at 450 x g for 10 min. Pellets are resuspended in sterile PBS or media (without FBS) to a particular concentration and the cells are implanted into the hindflank of the mice (8 - 10 mice per group, 2 - 10 x 10⁶ cells/animal). Tumor growth is measured over 3 to 6 weeks using venier calipers. Tumor volumes are calculated as a product of length x width x height unless otherwise indicated. P values are calculated using the Students t-test. Test compounds of Formula (I) in 50 - 100 µL excipient (DMSO, or VPD:D5W) can be delivered by IP injection at different concentrations generally starting at day one after implantation.

103

TUMOR INVASION MODEL

The following tumor invasion model has been developed and may be used for the evaluation of therapeutic value and efficacy of the compounds of Formula (I) identified to selectively inhibit KDR/FLK-1 receptor.

5 Procedure

Eight week old nude mice (female) (Simonsen Inc.) are used as experimental animals. Implantation of tumor cells can be performed in a laminar flow hood. For anesthesia, Xylazine/Ketamine Cocktail (100 mg/kg ketamine and 5 mg/kg Xylazine) are administered intraperitoneally. A midline incision is done to expose the abdominal cavity
10 (approximately 1.5 cm in length) to inject 10^7 tumor cells in a volume of 100 μ l medium. The cells are injected either into the duodenal lobe of the pancreas or under the serosa of the colon. The peritoneum and muscles are closed with a 6-0 silk continuous suture and the skin is closed by using wound clips. Animals are observed daily.

Analysis

15 After 2-6 weeks, depending on gross observations of the animals, the mice are sacrificed, and the local tumor metastases to various organs (lung, liver, brain, stomach, spleen, heart, muscle) are excised and analyzed (measurement of tumor size, grade of invasion, immunochemistry, in situ hybridization determination, etc.).

C-KIT ASSAY

20 This assay is used to detect the level of c-kit tyrosine phosphorylation.

MO7E (human acute myeloid leukemia) cells were serum starved overnight in 0.1% serum. Cells were pre-treated with the compound of Formula (I) (concurrent with serum starvation), prior to ligand stimulation. Cells were stimulated with 250 ng/ml rh-SCF for 15 minutes. Following stimulation, cells were lysed and immunoprecipitated with an anti-c-kit
25 antibody. Phosphotyrosine and protein levels were determined by Western blotting.

MTT PROLIFERATION ASSAY

MO7E cells were serum starved and pre-treated with a compound of Formula (I) as described for the phosphorylation experiments. Cells were plated @ 4×10^5 cells/well in a 96 well dish, in 100 μ l RPMI + 10% serum. rh-SCF (100 ng/mL) was added and the plate
30 was incubated for 48 hours. After 48 hours, 10 μ l of 5 mg/ml MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) was added and allowed to incubate for 4 hours. Acid isopropanol (100 μ l of 0.04N HCl in isopropanol) was added and the optical density was measured at a wavelength of 550 nm.

APOPTOSIS ASSAY

MO7E cells were incubated +/- SCF and +/- compound of Formula (I) in 10% FBS with rh-GM-CSF(10ng/mL) and rh-IL-3 (10ng/mL). Samples were assayed at 24 and 48 hours. To measure activated caspase-3, samples were washed with PBS and permeabilized with ice-cold 70% ethanol. The cells were then stained with PE-conjugated polyclonal rabbit anti-active caspase-3 and analyzed by FACS. To measure cleaved PARP, samples were lysed and analyzed by western blotting with an anti-PARP antibody.

Additional assays

Additional assays which may be used to evaluate the compounds of Formula (I) include, without limitation, a bio-flk-1 assay, an EGF receptor-HER2 chimeric receptor assay in whole cells, a bio-src assay, a bio-ick assay and an assay measuring the phosphorylation function of raf. The protocols for each of these assays may be found in U. S. Application Ser. No. 09/099,842, which is incorporated by reference, including any drawings, herein.

Measurement of Cell Toxicity

Therapeutic compounds should be more potent in inhibiting receptor tyrosine kinase activity than in exerting a cytotoxic effect. A measure of the effectiveness and cell toxicity of a compound can be obtained by determining the therapeutic index, i.e., IC_{50}/LD_{50} . IC_{50} , the dose required to achieve 50% inhibition, can be measured using standard techniques such as those described herein. LD_{50} , the dosage which results in 50% toxicity, can also be measured by standard techniques as well (Mossman, 1983, *J. Immunol. Methods*, 65:55-63), by measuring the amount of LDH released (Korzeniewski and Callewaert, 1983, *J. Immunol. Methods*, 64:313, Decker and Lohmann-Matthes, 1988, *J. Immunol. Methods*, 115:61), or by measuring the lethal dose in animal models. Compounds with a large therapeutic index are preferred. The therapeutic index should be greater than 2, preferably at least 10, more preferably at least 50.

B. Example of Cellular Assay Results Using 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80).

To confirm the potency of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) detected in biochemical assays(*vide infra*), the ability of said compound to inhibit ligand-dependent RTK phosphorylation was evaluated in cell-based assays using NIH-3T3 mouse cells engineered to overexpress Flk-1 or human PDGFR β . 5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) inhibited VEGF-dependent Flk-1 tyrosine phosphorylation with an IC_{50} value

106

of approximately 0.03 μM . This value is similar to the 0.009 μM K_i value determined for inhibition of Flk-1 by 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) determined in biochemical assays. This indicates that 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) readily penetrates into cells. Consistent with the biochemical data (*vide infra*) indicating that 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) had comparable activity against Flk-1 and PDGFR β , it was also found that it inhibited PDGF-dependent receptor phosphorylation in cells with an IC_{50} value of approximately 0.03 μM . The ability of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) to inhibit c-kit, a closely related RTK that binds stem cell factor (SCF), was determined using MO7E cells that express this receptor. In these cells, 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) inhibited SCF-dependent c-kit phosphorylation with an IC_{50} value of 0.01–0.1 μM . This compound also inhibited SCF-stimulated c-kit phosphorylation in acute myeloid leukemia (AML) blasts isolated from the peripheral blood of patients.

In addition to testing the ability of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) to inhibit ligand-dependent receptor phosphorylation in cells, its effect on ligand-dependent proliferative response of cells was also examined *in vitro* (see Table 4). In these studies, cells quiesced by overnight serum starvation were induced to undergo DNA synthesis upon addition of the appropriate mitogenic ligand. As shown in Table 3, 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) inhibited the PDGF-induced proliferation of NIH-3T3 cells overexpressing PDGFR β or PDGFR α with IC_{50} values 0.031 and 0.069 μM , respectively, and the SCF-induced proliferation of MO7E cells with an IC_{50} value of 0.007 μM .

TABLE 3

Receptor	Biochemical	Cellular IC ₅₀	
	K _i ¹ (μM)	Receptor Phosphorylation (μM)	Ligand-dependent Proliferation (μM)
Flk-1/KDR	0.009	0.03 ²	0.004 ³
PDGFRα	0.008	0.03 ⁴	0.031 ⁴
PDGFRβ	ND	ND	0.069 ⁵
FGFR	0.83	ND	0.7 ⁵
c-kit	ND	0.01-0.1 ⁶	0.007 ⁶
ND = Not Determined			
¹ Determined using recombinant enzyme			
² Determined using serum-starved NIH-3T3 cells expressing Flk-1			
³ Determined using serum-starved HUVECs			
⁴ Determined using serum-starved NIH-3T3 cells expressing PDGFRα			
⁵ Determined using serum-starved NIH-3T3 cells expressing PDGFRβ			
⁶ Determined using serum-starved MO7E cells			

5 As shown in Table 3, there is a general agreement between the biochemical and cellular activities of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) supporting the conclusion that this compound crosses cellular membranes. Further, it can be concluded that the cellular responses are a result of the activity of compound 80 against the indicated target. In contrast, 10 when tested in the presence of complete growth medium *in vitro*, substantially higher concentrations of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) (>10 μM) were required to inhibit the growth of a variety of human tumor cells (*see* Table 4). This indicates that the compound did not directly inhibit the growth of these cells at concentrations required 15 to inhibit ligand-dependent receptor phosphorylation and cell proliferation.

TABLE 4

Cell Line	Origin	IC ₅₀ (μM)	LD ₅₀ (μM)
HT29	Colon carcinoma	10	22
A549	Lung carcinoma	9.5	22
NCI-H460	NSC lung carcinoma	8.9	20
SF767T	Glioma	7.9	14
A431	Epidermoid carcinoma	6.0	18

20 Briefly, the results shown in Table 4 were obtained by incubating cells for 48 hr in complete growth medium in the presence of serial dilutions 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-

107

ethyl)amide. At the end of the growth period, the relative number of cells was determined. IC₅₀ values were calculated as the concentration of compound that inhibited the growth of cells by 50% relative to untreated cells. LD₅₀ values were calculated as the concentration of compound that caused a 50% reduction in the number of cells relative to those at the start of the experiment.

A more relevant cell-based assay in which to evaluate the anti-angiogenic potential of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) is the *in vitro* mitogenesis assay using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as a model system for the endothelial cell proliferation critical to the angiogenic process. In this assay, a mitogenic response, measured as an increase in DNA synthesis, is induced in serum-starved HUVECs upon addition of VEGF or FGF. In these cells, 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) inhibited the VEGF- and FGF-induced mitogenic response in a dose-dependent manner with IC₅₀ values of 0.004 μ M and 0.7 μ M, respectively, when compound was present throughout the 48-hr assay.

Briefly, the aforementioned results were obtained using Serum-starved HUVECs that were incubated with mitogenic concentrations of VEGF (100 ng/ml) or FGF (30 ng/ml) in the presence of serial dilutions of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) for 24 hrs. The mitogenic response during the following 24 hrs. in the presence of ligand and inhibitor was quantitated by measurement of DNA synthesis based on incorporation of bromodeoxyuridine into cellular DNA.

In separate experiments, compound 80 inhibited the VEGF-dependent phosphorylation of ERK 1/2 (p42/44MAP kinase), an early downstream target of Flk-1/KDR, in a dose-dependent manner. The inhibitory activity of compound 80 was also shown to be long-lasting in this system; inhibiting VEGF-dependent phosphorylation of ERK 1/2 for as long as 48 hours after removal of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) from the medium following a short (2 hr) exposure to micromolar concentrations of the compound.

VEGF has been recognized to be an important survival factor for endothelial cells. Since 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) inhibits the VEGF-dependent mitogenic response of HUVECs, the effect of the compound on HUVEC survival was investigated. In these experiments, cleavage of the caspase 3 substrate poly-ADP-ribosyl

polymerase (PARP) was used as a readout for apoptosis. HUVECs cultured in serum-free conditions for 24 hours exhibited substantial levels of PARP cleavage, as detected by the accumulation of the 23 kDa PARP cleavage fragment. This was largely prevented by the addition of VEGF to the cell medium, indicating that VEGF acts as a survival factor in this assay. 5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) has been shown to inhibit KDR signaling. Accordingly, 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) inhibited VEGF-mediated HUVEC survival in a dose-dependent manner. Thus, these data indicate that compound 80 induced apoptosis in endothelial cells in culture in the presence of VEGF.

C. *In vivo* Efficacy Studies

I. Efficacy Against Established Tumor Xenografts

The *in vivo* efficacy of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) was studied in subcutaneous (SC) xenograft models using human tumor cells implanted into the hindflank region of athymic mice. Following implantation, tumors were allowed to become established to a size of 100–550 mm³ prior to starting oral treatment with the compound.

Daily oral administration of compound 80 caused a dose-dependent inhibition of A431 tumor growth when treatment was initiated after tumors had grown to a size of 400 mm³. Statistically significant ($P < 0.05$) inhibition of tumor growth was seen at doses of 40 mg/kg/day (74% inhibition) and 80 mg/kg/day (84% inhibition) (see Table 6). In preliminary experiments, a higher (160 mg/kg/day) dose of the compound was not more efficacious against established A431 tumors than the 80 mg/kg/day dose. In addition, mice treated at the 160 mg/kg/day dose of the compound lost body weight, indicating that the higher dose was not as well tolerated. Similar results were obtained in an experiment in which A431 tumors were only allowed to reach 100 mm³ in size (see Table 4). In this second experiment, complete regression of the tumors occurred in six of the eight animals treated at the 80 mg/kg/day for 21 days. In these six animals, the tumors did not regrow during a 110-day observation period following the end of treatment. In the two animals in which the tumors regrew to a large size (2000–3000 mm³), the tumors regressed in response to a second round of treatment with compound 80. Importantly, in all efficacy experiments, 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) at 80 mg/kg/day has been well tolerated, even when dosed continuously for more than 100 days.

108

TABLE 5

Initial Tumor Volume (mm ³)	Compound ¹ (mg/kg/day)	% Inhibition (day)	P-Value
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 Compound 80.			

5 Briefly, the results shown in Table 5 were obtained using A431 cells (0.5 x 10⁶ cells/mouse) which were implanted SC into the hindflank region of athymic mice. Daily oral administration of 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) in a Cremophore-based vehicle or vehicle control began when tumors reached the indicated average volume. Tumors
10 were measured using vernier calipers and tumor volume was calculated as the product of length x width x height. P-values were calculated by comparing the size of the tumors for animals that were treated with compound 80 (n=8) to those of animals that were treated with a vehicle (n=16) on the last day of the experiment, using the two-tailed Student's t-test.

The efficacy compound 80 against established human tumors of different origins was
15 determined using Colo205 (colon carcinoma), SF763T (glioma), and NCI-H460 (non-small cell lung carcinoma) xenografts (see Table 6). These experiments were conducted using 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) administered orally at 80 mg/kg/day; a dose that was effective and well tolerated.

TABLE 6

	Tumor Type	Initial Tumor Volume (mm ³)	% Inhibition (day)	P-Value
A431 ¹	Epidermoid	100	93 (40)	0.002
A431 ¹	Epidermoid	400	84 (36)	0.001
Colo205	Colon	370	77 (54)	0.028
NCI-H460	Lung	300	61 (54)	0.003
SF763T	Glioma	550	53 (30)	0.001
¹ Data are from experiment reported in Table 5.				

In the abovementioned experiments, compound 80 was administered once daily at 80 mg/kg in a Cremophor-based vehicle once tumors reached the indicated size. Percent inhibition compared to the vehicle-treated control group was calculated at termination of the experiments. P-values were calculated by comparing tumor sizes of the animals that had been treated with the compound to tumor sizes of those animals that had been treated with the vehicle, using the two-tailed Student's t-test.

Although 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide (Compound 80) inhibited the growth of all the tumor types shown in Table 7, there was a difference in the response of the different xenograft models. Specifically, the growth of NCI-H460 and SF763T tumors was arrested or greatly slowed whereas the Colo205 tumors, like A431 tumors, regressed when treated with 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide.

In order to determine the molecular basis for the difference in response between xenograft models, the SF763T tumors were studied. Therefore, SF763T tumors, which were less responsive to treatment with 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)amide, have been evaluated at the molecular level using immunohistological techniques to determine the effect of treatment with the compound. These studies were initially conducted in this tumor type because SF763T tumors are highly vascularized with microvessels that strongly express the endothelial cell marker CD31 and are hence well suited for studies of tumor microvessel density (MVD). Immunohistological evaluation of SF763T tumors indicated that tumors from treated animals had reduced MVD relative to vehicle-treated controls, consistent with an anti-angiogenic mechanism of action for compound 80; MVD was 24.2 ± 4.1 in animals treated with compound 80, compared to 39.3 ± 5.7 for those that were treated with just the vehicle. As

anticipated from the associated tumor growth arrest, a pronounced inhibition of tumor cell proliferation was evident in tumors that were treated with compound 80. These tumors had half the mitotic index of those in vehicle-treated tumors (data not shown). The effect compound 80 on MVD and tumor cell proliferation indicates that the compound has profound anti-angiogenic and anti-tumor effects, even under conditions in which tumors do not regress.

The ability of compound 80 to inhibit PDGFR phosphorylation and subsequent signaling *in vivo* was also evaluated in the SF763T tumors, which express high levels of PDGFR β . Treatment of the SF763T tumors with compound 80 strongly inhibited PDGFR β tyrosine phosphorylation in established SF763T tumors. Compound 80 also reduced the levels of phosphorylated (activated) phospholipase C gamma (PLC- γ), an immediate downstream indicator of PDGFR activation. These data demonstrate that oral administration of compound 80 causes a direct effect on target (PDGFR) activity in tumors *in vivo*.

Based on the demonstration that the ability of compound 80 to inhibit VEGF-dependent signaling in HUVECs *in vitro* was long-lasting (*vide supra*), the efficacy of the compound was evaluated when the compound was administered infrequently in the Colo205 tumor model. As shown in Table 7, 80 mg/kg (91% inhibition) and 40 mg/kg (84% inhibition) were efficacious when administered daily, but not when administered twice weekly. In contrast, a higher dose of compound 80 (160 mg/kg) did inhibit (52% inhibition) the growth of established Colo205 tumors when administered twice weekly, suggesting that this compound can demonstrate efficacy when administered infrequently at a higher dose. It should be noted that dosing regimens may be determined by those with ordinary skill in the art without undue experimentation.

TABLE 7

Dose (mg/kg)	Frequency	% Inhibition	P-Value
160	Twice weekly	52	0.085
	Once weekly	17	NS
80	Daily	91	0.039
	Twice weekly	19	NS
	Once weekly	0	NS
40	Daily	84	0.028
	Twice weekly	36	NS
NS: not significant (P >0.05)			

Briefly, the results shown in Table 7 were obtained using Colo205 cells (0.5×10^6 cells/mouse) that had been implanted SC into the hindflank region of athymic mice. Oral administration of compound 80 according to the indicated schedule began when tumors

reached 400 mm³. Tumors were measured using vernier calipers and tumor volume was calculated as the product of length x width x height. P-values were calculated by comparing the size of the tumors for animals that were treated with compound 80 to those of animals that were treated with a vehicle on the last day of the experiment, using the two-tailed Student's t-test.

ii. Efficacy of Compound 80 in a Model of Disseminated Disease

In addition to supporting the sustained growth of solid primary tumors, angiogenesis is also an essential component supporting the development of disseminated disease due to metastasis from the primary tumor. The effect of compound 80 on the development of disseminated disease was examined in the B16-F1 mouse melanoma lung colonization model. In this model, B16-F1 cells inoculated intravenously via the tail vein of athymic mice colonize the lungs and form tumors. As shown in Table 7, oral administration of compound 80 at 80 mg/kg/day effectively reduced the burden of B16-F1 cells in the lung as evaluated by measurements of total lung weight. These data suggest that compound 80 can inhibit disseminated disease *in vivo*.

TABLE 8

	Lung Weight (g)	% Inhibition	P-Value
Vehicle	0.83 ± 0.07	-	-
Compound ¹	0.41 ± 0.04	50	<0.001
¹ Compound 80			

Briefly, the results shown in Table 8 were obtained using athymic mice that had been inoculated with B16-F1 tumor cells (5x10⁵ cells/mouse) via the tail vein. Mice were treated daily with orally administered compound 80 at 80 mg/kg/day (n=10) or vehicle (n=18) for 24 days after tumor cell inoculation. At the end of the treatment period, the mice were sacrificed and their lungs removed and weighed. Percent inhibition was calculated by comparing the lung weight of those animals that had been treated with compound 80, with the lung weight of the animals that had only been treated with vehicle. P-values were determined using the two-tailed Student's t-test.

II. COX-2 Inhibitors

The ability of COX-2 inhibitors to retard the growth of tumors was tested using the Lewis Lung Model described below.

j40

Mice were injected subcutaneously in the left paw (1×10^6 tumor cells suspended in 30 % Matrigel) and tumor volume was evaluated using a plethysmometer twice a week for 30-60 days. Blood was drawn twice during the experiment in a 24 h protocol to assess plasma concentration and total exposure by AUC analysis. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Student's and Mann-Whitney tests were used to assess differences between means using the InStat software package. Celecoxib given in the diet at doses between 160-3200 ppm retarded the growth of these tumors. The inhibitory effect of celecoxib was dose-dependent and ranged from 48 % to 85 % as compared with the control tumors. Analysis of lung metastasis was done in all the animals by counting metastasis in a stereomicroscope and by histochemical analysis of consecutive lung sections. Celecoxib did not affect lung metastasis at the lower dose of 160 ppm, however surface metastasis was reduced by more than 50 % when given at doses between 480-3200 ppm. In addition, histopathological analysis revealed that celecoxib dose-dependently reduced the size of the metastatic lesions in the lung.

2. HT-29 Model:

Mice were injected subcutaneously in the left paw (1×10^6 tumor cells suspended in 30 % Matrigel) and tumor volume was evaluated using a plethysmometer twice a week for 30-60 days. Implantation of human colon cancer cells (HT-29) into nude mice produces tumors that will reach 0.6-2 ml between 30-50 days. Blood was drawn twice during the experiment in a 24 h protocol to assess plasma concentration and total exposure by AUC analysis. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Student's and Mann-Whitney tests were used to assess differences between means using the InStat software package.

A. Mice injected with HT-29 cancer cells were treated with cytoxin i.p at doses of 50 mg/kg on days 5,7 and 9 in the presence or absence of celecoxib in the diet. The efficacy of both agents were determined by measuring tumor volume. Treatment using a celecoxib related COX-2 inhibitor (SC-58236) reduced tumor volume by 89 %. In the same assay, indomethacin given at near the maximum tolerated dose of 2 mg/kg/day in the drinking water inhibited tumor formation by 77%. Moreover, the COX-2 selective inhibitor completely inhibited the formation of lung metastasis while the non-selective NSAID indomethacin was ineffective. The results from these studies demonstrate that celecoxib administered in the diet to tumor bearing mice can delay the growth of tumors and metastasis when administered as sole therapy. Moreover, a positive benefit is observed when celecoxib is administered in combination with a cytotoxic agent such as cyclophosphamide.

B. In a second assay, mice injected with HT-29 colon cancer cells were treated with celecoxib (10, 40 or 160 ppm) in the diet beginning at day 10. An approximate dose dependent effect was observed. (Table 9).

5 Table 9. Celecoxib Inhibits HT-29 Human Colon Carcinoma

Days	vehicle	10 ppm	40 ppm	160 ppm
14	0.114	0.124	0.125	0.120
22	0.25	0.25	0.19	0.14
28	0.45	0.36	0.27	0.21
35	0.79	0.57	0.4	0.3
42	1.38	0.89	0.68	0.49
50	1.9	1.49	1.04	0.8

Volume (ml)

III. In Vivo assays using protein kinases in combination with a Cyclooxygenase-2 selective inhibitor for treating Cancer.

10 The ability of a protein kinase inhibitor to retard the growth of tumors in combination with a COX-2 selective inhibitor can be tested in 1483 xenograft model described below.

1483 xenograft is an animal xenograft that models human epithelial cancers expressing cyclooxygenase-2 (COX-2) in the tumor cells and in the vasculature.

15 A human tumor xenograft nude mouse model of head and neck squamous cell carcinoma (1483 cell line) that expresses COX-2 in the tumor cells and in the vasculature, similar to human epithelial cancers. We believe this model represents human epithelial cancers and would be a good model to correlate efficacy of anti-cancer drugs including COX-2 inhibitors to efficacy in humans.

Materials and Methods:

20 **Cell Culture:**

1483 human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells are stored in frozen vials containing 3×10^6 cells, 90 % fetal bovine serum (FBS) and 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO). Take a frozen vial and quickly thaw at 37°C and placed in a T-162 cm² (Corning) flask containing D-MEM/F12 media (GibcoBRL) with 15mM Hepes buffer, L-glutamine, pyridoxine hydrochloride and 10 % FBS. Cells are grown in an incubator with 5 % CO₂ and temperature at 37°C. Media is changed every other day and cells are passed when at 80-90 % confluence. For passing of cells, wash flask with 10 ml of phosphate buffered saline

MM

(PBS), aspirate off and add 2 ml of trypsin/EDTA (0.25 % / 1 mM, GibcoBRL) place back in incubator, after 5 min., cells will detach. Add 8 ml of above media to flask rinse and transfer to a sterile 50 ml centrifuge tube. Add 30 ml more of media and mix and count cells using a hemacytometer, plate out cells in a T-162 cm² containing 3-4 x 10⁶ cells.

5 1483 Animal Model:

Change media 24 hours before harvest of 1483 cells before injection in to nude mice. Trypsinize 1483 cells as described above in cell culture section. Count cells and determine number of cells. Centrifuge cells down at 1000 rpm for 5 minutes at room temperature. Resuspended cell pellets and pool them (if multiple 50 ml centrifuge tubes) into one 50 ml centrifuge tube with Hank's buffered saline solution (HBSS, GibcoBRL) and centrifuge as before. You will want to have about 25 % more cells than what you really need for injection to have extra cells. If you are injecting 72 mice and you have 100 x 10⁶ cells, prepare all the cells for injecting into mice. Inject 1483 cells at 1 x 10⁶ cells in 0.03 ml/mouse.

Inject cells with 30 % Matrigel (Collaborative Biomedical Products) and 70 % HBSS.

15 Resuspend pooled pellet with 2.1 ml (70%) of cold HBSS then add 0.9 ml (30 %) of thawed liquefied cold Matrigel and mix well on ice. Keep this cell preparation on ice at all times prior to injecting into mice. Male nude mice age 4-6 weeks old are used in these studies (Harlen). Anesthetize the mice using CO₂/O₂ gas and then inject them in the middle of the right hind paw using a 0.5cc tuberculin syringe (Beckerson & Dickerson). Weigh the mice for body weight on day of injection (Day 0) for baseline weight for start of study. Weigh the mice on day 7 and measure the right hind paw for paw tumor volume using a plethysmometer (Stoelting Co.). The plethysmometer is a machine that measure paw volume by water displacement. Measure a few left non-injected paws and average for a background measurement to subtract from the right tumor bearing paw.

25 Place the animals on test compounds in chow meal when tumors are 100-200ul in size and continue on compound meal throughout study. Some mice are given only a protein kinase inhibitor or a cyclooxygenase-2 selective inhibitor. Some mice are given both a protein kinase inhibitor and a cyclooxygenase-2 selective inhibitor daily at a suitable dose determined based on the in vitro assay results.

30 Weigh and measure the mice throughout the study on days 7, 10, 14, 17, 21, 24 and 28. Animals can be started on compound treatment on day 0 (prophylactic) or once there is an established tumor around day 7 (therapeutic). Around day 30 vehicle (control) mice will have large tumors (~1.0 -1.5 ml) and start to lose weight, at this time terminate the vehicle animals. If tumor inhibition is seen in treated groups and they are in good health, euthanize half of the treated groups and keep half of the treated group alive to determine the delay in tumor growth.

One skilled in the art would also readily appreciate that the present invention is well adapted to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned, as well as those inherent herein. The molecular complexes and the methods, procedures, treatments,
5 molecules, specific compounds described herein are presently representative of preferred embodiments, are exemplary, and are not intended as limitations on the scope of the invention. Changes therein and other uses will occur to those skilled in the art which are encompassed within the spirit of the invention are defined by the scope of the claims.

It will be readily apparent to one skilled in the art that varying substitutions and
10 modifications may be made to the invention disclosed herein without departing from the scope and spirit of the invention.

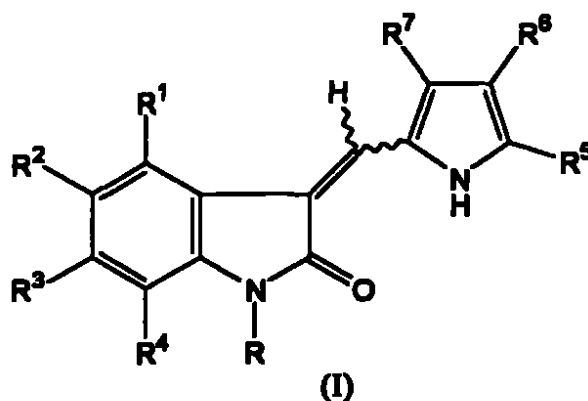
All patents and publications mentioned in the specification are indicative of the levels of those skilled in the art to which the invention pertains. All patents and publications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was
15 specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

112

What is claimed is:

1. A method for the treatment or prevention of cancers comprising administering to a mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of:

5 a protein kinase inhibitor of the Formula (I):



wherein:

10 R is selected from the group consisting of hydrogen, piperazin-1-ylmethyl, 4-methylpiperazin-1-ylmethyl, piperidin-1-ylmethyl, 2-hydroxymethylpyrrolidin-1-ylmethyl, 2-carboxypyrrolidin-1-ylmethyl, and pyrrolidin-1-ylmethyl;

R¹ is selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyclic, hydroxy, alkoxy, -
15 C(O)NR⁸R⁹, -NR¹³R¹⁴, -(CO)R¹⁵, and -(CH₂)_nR¹⁶;

R² is selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, substituted alkyl, trihalomethyl, hydroxy, alkoxy, cyano, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -C(O)R¹⁵, aryl, heteroaryl, and -S(O)₂NR¹³R¹⁴;

R³ is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, substituted alkyl, trihalomethyl, hydroxy, alkoxy, aryl, heteroaryl, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³S(O)₂R¹⁴, -S(O)₂NR¹³R¹⁴, -
20 NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -(CO)R¹⁵, and -SO₂R¹⁹;

R⁴ is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, substituted alkyl, hydroxy, alkoxy, and -NR¹³R¹⁴;

R⁵ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and -
25 C(O)R¹⁰;

R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and -C(O)R¹⁰;

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, heteroaryl, $-C(O)R^{17}$, and $-C(O)R^{10}$ provided that when R is hydrogen then at least one of R^5 , R^6 and R^7 is $-C(O)R^{10}$; or

R^6 and R^7 may combine to form a group selected from the group consisting of $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ and $-(CH_2)_6-$;

R^8 and R^9 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and aryl;

R^{10} is selected from the group consisting of hydroxy, alkoxy, aryloxy, $-N(R^{11})(alkylene)_nR^{12}$ wherein the alkylene group is optionally substituted with a hydroxy group, and $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, and substituted alkyl;

R^{12} is selected from the group consisting of $-NR^{13}R^{14}$, hydroxy, $-C(O)R^{15}$, aryl, heteroaryl, $-N^+(O)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$, and $-NHC(O)R^{18}$ (wherein R^{18} is alkyl, substituted alkyl, haloalkyl, or aralkyl);

R^{13} and R^{14} are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, lower alkyl substituted with hydroxyalkylamino, cyanoalkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl and heteroaryl; or

R^{13} and R^{14} may combine to form a heterocyclo group;

R^{15} is selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy, alkoxy and aryloxy;

R^{16} is selected from the group consisting of hydroxy, $-NR^{13}R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, and $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} is selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, aryl and heteroaryl;

R^{19} is selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, or heteroaralkyl; and

n and r are independently 1, 2, 3, or 4;

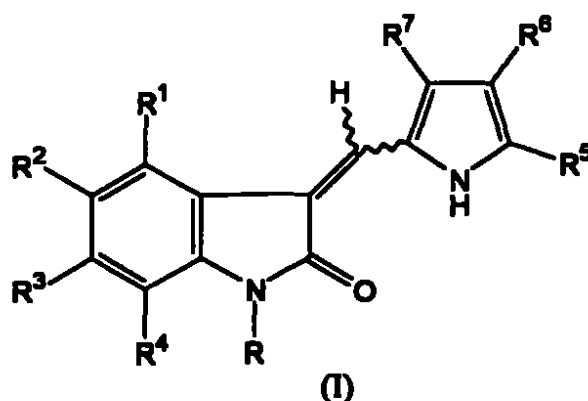
in combination with a cyclooxygenase inhibitor;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. A method for the treatment or prevention of cancers comprising administering to a mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of:

143

a protein kinase inhibitor of the Formula (I):



5 wherein:

R is selected from the group consisting of hydrogen, piperazin-1-ylmethyl, 4-methylpiperazin-1-ylmethyl, piperidin-1-ylmethyl, 2-hydroxymethylpyrrolidin-1-ylmethyl, 2-carboxypyrrolidin-1-ylmethyl, and pyrrolidin-1-ylmethyl;

10 R¹ is selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyclic, hydroxy, alkoxy, -C(O)NR⁸R⁹, -NR¹³R¹⁴, -(CO)R¹⁵, and -(CH₂)_nR¹⁶;

R² is selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, substituted alkyl, trihalomethyl, hydroxy, alkoxy, cyano, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -C(O)R¹⁵, aryl, heteroaryl, and -S(O)₂NR¹³R¹⁴;

15 R³ is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, substituted alkyl, trihalomethyl, hydroxy, alkoxy, aryl, heteroaryl, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³S(O)₂R¹⁴, -S(O)₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -(CO)R¹⁵, and -SO₂R¹⁹;

R⁴ is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, substituted alkyl, hydroxy, alkoxy, and -NR¹³R¹⁴;

20 R⁵ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and -C(O)R¹⁰;

R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and -C(O)R¹⁰;

25 R⁷ is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, heteroaryl, -C(O)R¹⁷, and -C(O)R¹⁰ provided that when R is hydrogen then at least one of R⁵, R⁶ and R⁷ is -C(O)R¹⁰; or

R^6 and R^7 may combine to form a group selected from the group consisting of $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ and $-(CH_2)_6-$;

R^8 and R^9 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and aryl;

- 5 R^{10} is selected from the group consisting of hydroxy, alkoxy, aryloxy, $-N(R^{11})(alkylene)_nR^{12}$ wherein the alkylene group is optionally substituted with a hydroxy group, and $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, and substituted alkyl;

- 10 R^{12} is selected from the group consisting of $-NR^{13}R^{14}$, hydroxy, $-C(O)R^{15}$, aryl, heteroaryl, $-N^+(O)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$, and $-NHC(O)R^{18}$ (wherein R^{18} is alkyl, substituted alkyl, haloalkyl, or aralkyl);

R^{13} and R^{14} are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, lower alkyl substituted with hydroxyalkylamino, cyanoalkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl and heteroaryl; or

- 15 R^{13} and R^{14} may combine to form a heterocyclo group;

R^{15} is selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy, alkoxy and aryloxy;

R^{16} is selected from the group consisting of hydroxy, $-NR^{13}R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, and $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

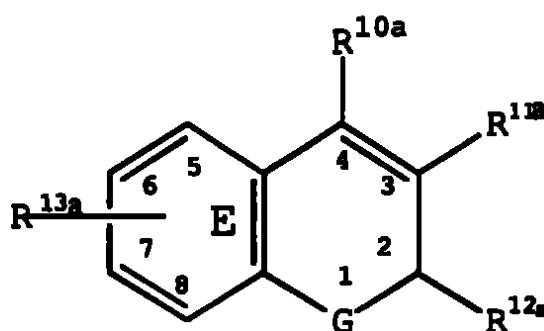
- 20 R^{17} is selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, aryl and heteroaryl;

R^{19} is selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, or heteroaralkyl; and

n and r are independently 1, 2, 3, or 4;

- 25 in combination with a cyclooxygenase-2 selective inhibitor selected from the group consisting of:

(i) a compound of Formula (II):



114

wherein:

G is selected from the group consisting of O, S, and -NR^a- wherein R^a is hydrogen or alkyl;

5 R^{10a} is selected from the group consisting of hydrogen and aryl;

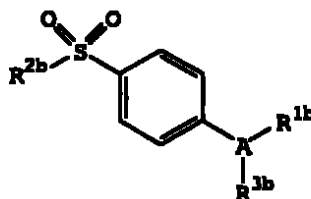
R^{11a} is selected from the group consisting of carboxyl, alkyl, aralkyl, aminocarbonyl, alkylsulfonylaminocarbonyl, and alkoxycarbonyl;

10 R^{12a} is selected from the group consisting of haloalkyl, alkyl, aralkyl, cycloalkyl and aryl optionally substituted with one or more radicals selected from alkylthio, nitro and alkylsulfonyl; and

R^{13a} is one or more radicals independently selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, aralkyl, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy, aralkyloxy, heteroaralkyloxy, haloalkyl, haloalkoxy, alkylamino, arylamino, aralkylamino, heteroarylamino, heteroarylalkylamino, nitro, amino, aminosulfonyl, alkylaminosulfonyl, arylaminosulfonyl, 15 heteroarylaminosulfonyl, aralkylaminosulfonyl, heteroaralkylaminosulfonyl, heterocyclosulfonyl, alkylsulfonyl, hydroxyarylcarbonyl, nitroaryl, optionally substituted aryl, optionally substituted heteroaryl, aralkylcarbonyl, heteroarylcarbonyl, arylcarbonyl, aminocarbonyl, and alkylcarbonyl;

or R^{13a} together with ring E forms a naphthyl ring; or

20 (iii) a compound of Formula (III):



(III)

wherein:

25 A is selected from the group consisting of partially unsaturated or unsaturated heterocyclyl and partially unsaturated or unsaturated carbocyclic rings;

R^{1b} is selected from the group consisting of heterocyclyl, cycloalkyl, cycloalkenyl and aryl, wherein R^{1b} is optionally substituted at a substitutable position with one or more radicals independently selected from alkyl, haloalkyl, cyano, 30 carboxyl, alkoxycarbonyl, hydroxyl, hydroxyalkyl, haloalkoxy, amino, alkylamino, arylamino, nitro, alkoxyalkyl, alkylsulfinyl, halo, alkoxy, and alkylthio;

R^{2b} is selected from the group consisting of methyl and amino; and

R^{3b} is selected from the group consisting of a radical selected from hydrogen, halo, alkyl, alkenyl, alkynyl, oxo, cyano, carboxyl, cyanoalkyl, heterocyclyloxy, alkyloxy, alkylthio, alkylcarbonyl, cycloalkyl, aryl, haloalkyl, heterocyclyl, cycloalkenyl, aralkyl, heterocyclalkyl, acyl, alkylthioalkyl, hydroxyalkyl, alkoxycarbonyl, arylcarbonyl, aralkylcarbonyl, aralkenyl, alkoxyalkyl, arylthioalkyl, aryloxyalkyl, aralkylthioalkyl, aralkoxyalkyl, alkoxyaralkoxyalkyl, alkoxycarbonylalkyl, aminocarbonyl, aminocarbonylalkyl, alkylaminocarbonyl, N- arylaminocarbonyl, N-alkyl-N-arylaminocarbonyl, alkylaminocarbonylalkyl, carboxyalkyl, alkylamino, N-arylamino, N-aralkylamino, N-alkyl-N-aralkylamino, N-alkyl-N-arylamino, aminoalkyl, alkylaminoalkyl, N-arylaminalkyl, N-aralkylaminalkyl, N-alkyl-N-aralkylaminalkyl, N-alkyl-N-arylaminalkyl, aryloxy, aralkoxy, arylthio, aralkylthio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, aminosulfonyl, alkylaminosulfonyl, N-arylaminosulfonyl, arylsulfonyl, and N-alkyl-N-arylaminosulfonyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

3. The method of claim 2, wherein the cyclooxygenase-2 selective inhibitor is a compound of Formula (II) wherein:

G is selected from the group consisting of oxygen and sulfur;

R^{11a} is selected from the group consisting of carboxyl, lower alkyl, lower aralkyl and lower alkoxycarbonyl;

R^{12a} is selected from the group consisting of lower haloalkyl, lower cycloalkyl and phenyl; and

R^{13a} is one or more radicals selected from the group consisting of H, halo, lower alkyl, lower alkoxy, lower haloalkyl, lower haloalkoxy, lower alkylamino, nitro, amino, aminosulfonyl, lower alkylaminosulfonyl, 5-membered heteroarylalkylaminosulfonyl, 6-membered heteroarylalkylaminosulfonyl, lower aralkylaminosulfonyl, 5-membered nitrogen containing heterocyclosulfonyl, 6-membered nitrogen containing heterocyclosulfonyl, lower alkylsulfonyl, optionally substituted phenyl, lower aralkylcarbonyl, and lower alkylcarbonyl; or **R^{13a}** together with ring E forms a naphthyl radical.

4. The method of claim 3 wherein:

R^{11a} is carboxyl;

R^{12a} is lower haloalkyl; and

445

R^{13a} is one or more radicals selected from the group consisting of H, halo, lower alkyl, lower haloalkyl, lower haloalkoxy, lower alkylamino, amino, aminosulfonyl, lower alkylaminosulfonyl, 5-membered heteroarylalkylaminosulfonyl, 6-membered heteroarylalkylaminosulfonyl, lower aralkylaminosulfonyl, lower alkylsulfonyl, 6-membered nitrogen containing heterocyclosulfonyl, optionally substituted phenyl, lower aralkylcarbonyl, and lower alkylcarbonyl; or R^{13a} together with ring E forms a naphthyl radical.

5. The method of claim 4, wherein:

R^{12a} is selected from the group consisting of fluoromethyl, chloromethyl, dichloromethyl, trichloromethyl, pentafluoroethyl, heptafluoropropyl, difluoroethyl, difluoropropyl, dichloroethyl, dichloropropyl, difluoromethyl, and trifluoromethyl; and R^{13a} is one or more radicals selected from the group consisting of hydrido, chloro, fluoro, bromo, iodo, methyl, ethyl, isopropyl, *tert*-butyl, butyl, isobutyl, pentyl, hexyl, methoxy, ethoxy, isopropoxy, *tert*butyloxy, trifluoromethyl, difluoromethyl, trifluoromethoxy, amino, N,N-dimethylamino, N,N-diethylamino, N-phenylmethylaminosulfonyl, N-phenylethylaminosulfonyl, N-(2-furylmethyl)aminosulfonyl, nitro, N,N-dimethylaminosulfonyl, aminosulfonyl, N-methylaminosulfonyl, N-ethylsulfonyl, 2,2-dimethylethylaminosulfonyl, N,N-dimethylaminosulfonyl, N-(2-methylpropyl)aminosulfonyl, N-morpholinosulfonyl, methylsulfonyl, benzylcarbonyl, 2,2-dimethylpropylcarbonyl, phenylacetyl and phenyl; or R^{13a} together with ring E forms a naphthyl radical.

6. The method of claim 5, wherein:

R^{12a} is selected from the group consisting of trifluoromethyl and pentafluoroethyl; and R^{13a} is one or more radicals selected from the group consisting of hydrido, chloro, fluoro, bromo, iodo, methyl, ethyl, isopropyl, *tert*-butyl, methoxy, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, N-phenylmethylaminosulfonyl, N-phenylethylaminosulfonyl, N-(2-furylmethyl)aminosulfonyl, N,N-dimethylaminosulfonyl, N-methylaminosulfonyl, N-(2,2-dimethylethyl)aminosulfonyl, dimethylaminosulfonyl, 2-methylpropylaminosulfonyl, N-morpholinosulfonyl, methylsulfonyl, benzylcarbonyl, and phenyl; or wherein R^{13a} together with ring E forms a naphthyl radical.

7. The method of claim 2, wherein the cyclooxygenase-2 selective inhibitor is selected from the group consisting of:

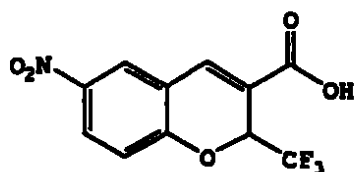
6-chloro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;

- 6-chloro-7-methyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
8-(1-methylethyl)-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-chloro-7-(1,1-dimethylethyl)-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-chloro-8-(1-methylethyl)-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
- 5 2-trifluoromethyl-3H-naphthopyran-3-carboxylic acid ;
7-(1,1-dimethylethyl)-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-bromo-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
8-chloro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-trifluoromethoxy-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
- 10 5,7-dichloro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
8-phenyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
7,8-dimethyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6,8-bis(dimethylethyl)-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
7-(1-methylethyl)-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
- 15 7-phenyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-chloro-7-ethyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-chloro-8-ethyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-chloro-7-phenyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6,7-dichloro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
- 20 6,8-dichloro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
2-trifluoromethyl-3H-naptho[2,1-b]pyran-3-carboxylic acid;
6-chloro-8-methyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
8-chloro-6-methyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
8-chloro-6-methoxy-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
- 25 6-bromo-8-chloro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
8-bromo-6-fluoro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
8-bromo-6-methyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;

116

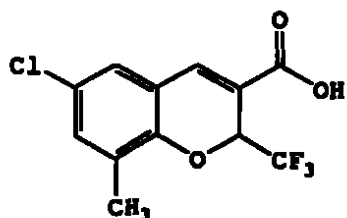
- 8-bromo-5-fluoro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-chloro-8-fluoro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-bromo-8-methoxy-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-[[[(phenylmethyl)amino]sulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
5 6-[(dimethylamino)sulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-[(methylamino)sulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-[(4-morpholino)sulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-[(1,1-dimethylethyl)aminosulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-[(2-methylpropyl)aminosulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
10 6-methylsulfonyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
8-chloro-6-[[[(phenylmethyl)amino]sulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic
acid;
6-phenylacetyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6,8-dibromo-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
15 8-chloro-5,6-dimethyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6,8-dichloro-(S)-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-benzylsulfonyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-[[N-(2-furylmethyl)amino]sulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
6-[[N-(2-phenylethyl)amino]sulfonyl]-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
20 6-iodo-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid;
7-(1,1-dimethylethyl)-2-pentafluoroethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid; and
6-chloro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzothiopyran-3-carboxylic acid; or a pharmaceutically
acceptable salt thereof.
- 25 8. The method of claim 2, wherein the cyclooxygenase-2 selective inhibitor is a
compound selected from the group consisting of:

a)



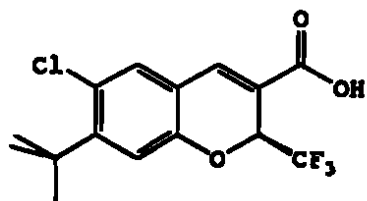
6-Nitro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

b)



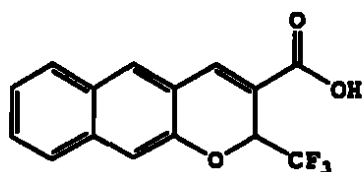
5 6-Chloro-8-methyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

c)



((S)-6-Chloro-7-(1,1-dimethylethyl)-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

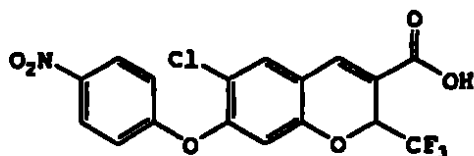
10 d)



2-Trifluoromethyl-2H-naphtho[2,3-b]pyran-3-carboxylic acid

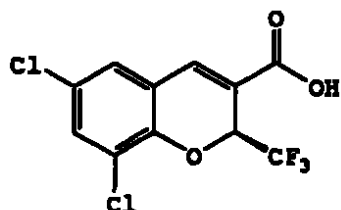
112

e)



6-Chloro-7-(4-nitrophenoxy)-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

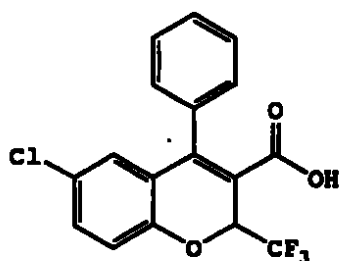
f)



((S)-6,8-Dichloro-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

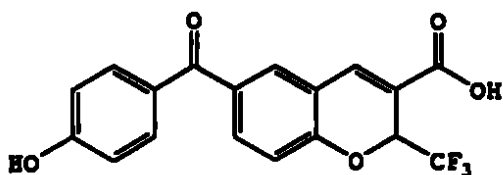
5

g)



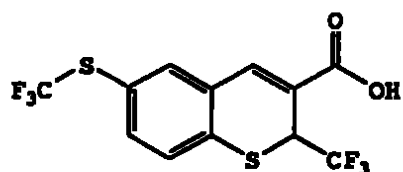
6-Chloro-2-(trifluoromethyl)-4-phenyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

10 h)



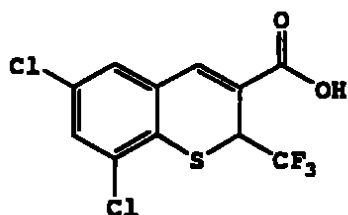
6-(4-Hydroxybenzoyl)-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

i)



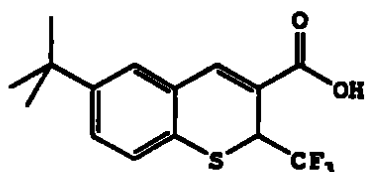
2-(Trifluoromethyl)-6-[(trifluoromethyl)thio]
-2H-1-benzothiopyran-3-carboxylic acid

j)



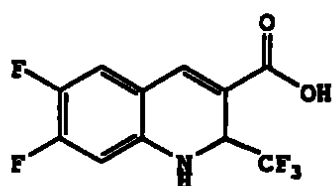
5 6,8-Dichloro-2-trifluoromethyl-2H-1-
benzothiopyran-3-carboxylic acid

k)



6-(1,1-Dimethylethyl)-2-(trifluoromethyl)
-2H-1-benzothiopyran-3-carboxylic acid

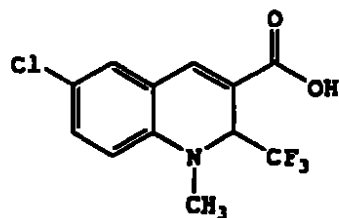
10 l)



6,7-Difluoro-1,2-dihydro-2-(trifluoro
methyl)-3-quinolinecarboxylic acid

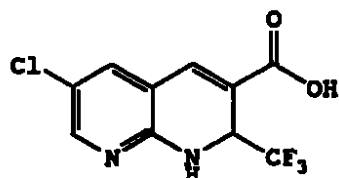
178

m)



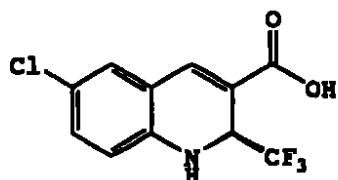
6-Chloro-1,2-dihydro-1-methyl-2-(trifluoromethyl)-3-quinolinecarboxylic acid

n)



6-Chloro-2-(trifluoromethyl)-1,2-dihydro[1,8]naphthyridine-3-carboxylic acid

o)



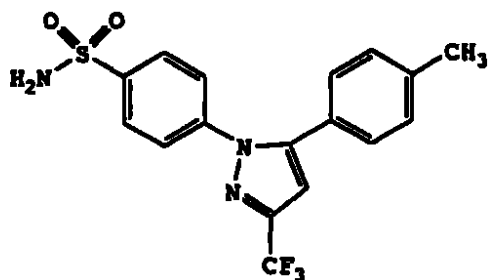
(S)-6-Chloro-1,2-dihydro-2-(trifluoromethyl)-3-quinolinecarboxylic acid

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and any combination thereof.

10

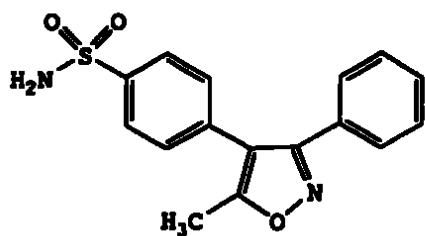
9. The method of claim 2, wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is a compound of Formula (III) selected from the group consisting of:

a)

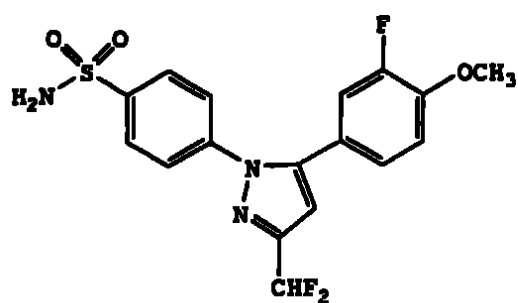


15

b)

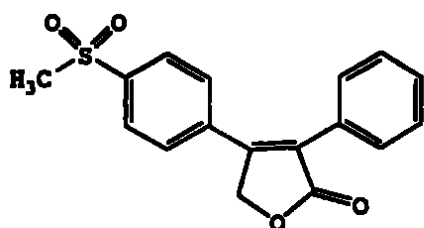


c)



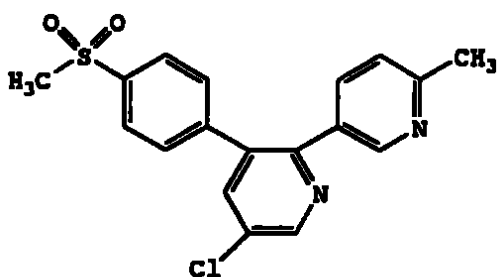
5

d)

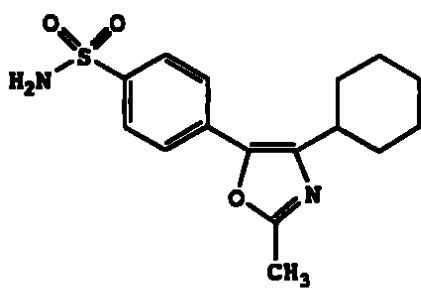


10

e)



f)



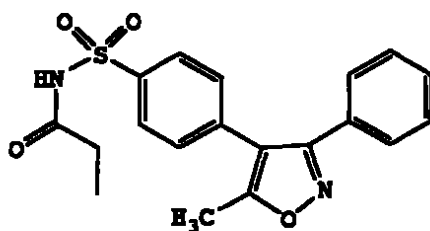
15

179

or a pharmaceutically acceptable salt thereof; and any combination thereof.

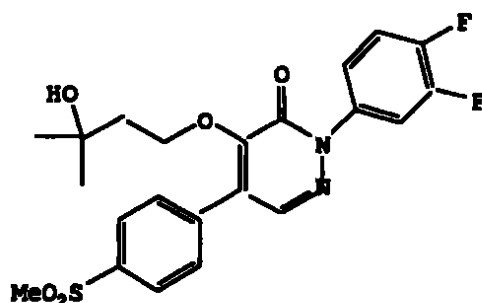
10. The method of claim 3, wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is selected from the group consisting of:

a)



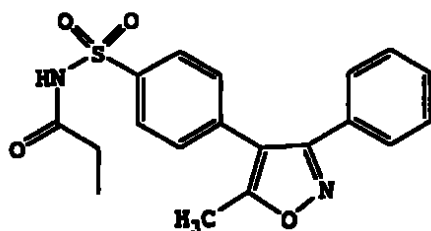
and

b)



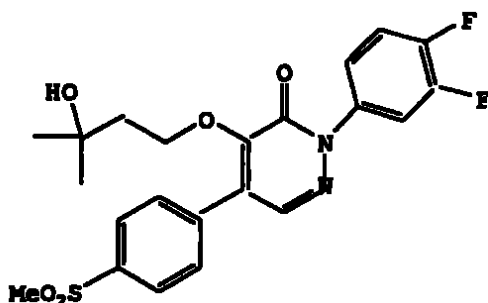
or a pharmaceutically acceptable salt thereof; and any combination thereof.

11. The method of claim 2, wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

12. The method of claim 2, wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5

13. The method of claim 1 wherein the cyclooxygenase-2 selective inhibitor is 4-[4-(methyl)-sulfonyl]phenyl]-3-phenyl-2(5H)-furanone, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

10

14. The method of claim 2 wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is 4-[(5-methyl-3-phenyl)-4-isoxazolyl]phenylsulfonamide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15

15. The method of claim 1 wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is 2-(6-methylpyrid-3-yl)-3-(4-methylsulfonylphenyl)-5-chloropyridine, or a pharmaceutically acceptable salt.

20

16. The method of claim 2 wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenylsulfonamide, or a pharmaceutically acceptable salt.

25

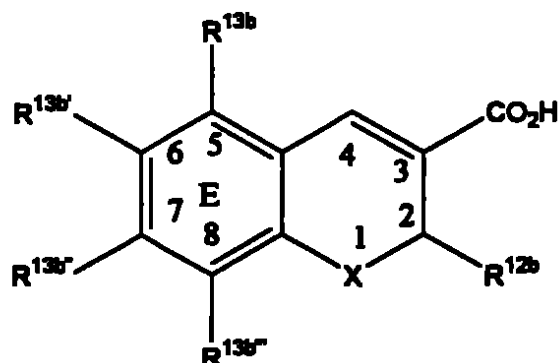
17. The method of claim 2 wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is 4-[(2-methyl-4-cyclohexyl)-5-oxazolyl]phenylsulfonamide, or a pharmaceutically acceptable salt.

18. The method of claim 2 wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is 4-[5-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)-3-(difluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide, or a pharmaceutically acceptable salt.

120

19. The method of claim 2 wherein said cyclooxygenase-2 selective inhibitor is (S)-6,8-dichloro-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt.

20. The method of claim 2, wherein the cyclooxygenase-2 selective inhibitor is a compound of the formula:



wherein:

10 X is O or S;

R^{12b} is lower haloalkyl;

R^{3b} is selected from the group consisting of hydrido and halo;

15 R^{13b'} is selected from the group consisting of hydrido, halo, lower alkyl, lower haloalkoxy, lower alkoxy, lower aralkylcarbonyl, lower dialkylaminosulfonyl, lower alkylaminosulfonyl, lower aralkylaminosulfonyl, lower heteroaralkylaminosulfonyl, a 5-membered nitrogen containing heterocyclosulfonyl, and a 6-membered nitrogen containing heterocyclosulfonyl;

R^{13b''} is selected from the group consisting of hydrido, lower alkyl, halo, lower alkoxy, and aryl; and

20 R^{13b'''} is selected from the group consisting of hydrido, halo, lower alkyl, lower alkoxy, and aryl; or
a pharmaceutically acceptable salt thereof.

21. The method of claim 20, wherein:

25 R^{12b} is selected from the group consisting of trifluoromethyl and pentafluoroethyl;

R^{13b} is selected from the group consisting of hydrido, chloro, and fluoro;

R^{13b'} is selected from the group consisting of hydrido, chloro, bromo, fluoro, iodo, methyl, tert-butyl, trifluoromethoxy, methoxy, benzylcarbonyl, dimethylaminosulfonyl,

isopropylaminosulfonyl, methylaminosulfonyl, benzylaminosulfonyl, phenylethylaminosulfonyl, methylpropylaminosulfonyl, methylsulfonyl, and morpholinosulfonyl;

5 R^{13a} is selected from the group consisting of hydrido, methyl, ethyl, isopropyl, *tert*-butyl, chloro, methoxy, diethylamino, and phenyl; and

R^{13b} is selected from the group consisting of hydrido, chloro, bromo, fluoro, methyl, ethyl, *tert*-butyl, methoxy, and phenyl.

10 22. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein:

R^1 is selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, cycloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyclic, hydroxy, alkoxy, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_nR^{16}$ and $-C(O)NR^8R^9$;

15 R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, halo, alkyl, trihalomethyl, hydroxy, alkoxy, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, aryl, heteroaryl, and $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, trihalomethyl, hydroxy, alkoxy, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, aryl, heteroaryl, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, and $-NR^{13}C(O)OR^{14}$;

20 R^4 is selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, hydroxy, alkoxy and $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, and $-C(O)R^{10}$;

R^6 is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, and $-C(O)R^{10}$;

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, aryl, 3-carboxypropyl, heteroaryl, $-C(O)R^{17}$ and $-C(O)R^{10}$;

25 R^6 and R^7 may combine to form a group selected from the group consisting of $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_5$ and $-(CH_2)_6$;

R^8 and R^9 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl and aryl;

30 R^{10} is selected from the group consisting of hydroxy, alkoxy, aryloxy, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ and $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

R^{12} is selected from the group consisting of $-NR^{13}R^{14}$, hydroxy, $-C(O)R^{15}$, aryl and heteroaryl;

35 R^{13} and R^{14} are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, cycloalkyl, aryl and heteroaryl;

428

R^{13} and R^{14} may combine to form a group selected from the group consisting of -
 $(CH_2)_4$ -, $-(CH_2)_5$ -, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2$ -, and $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$ -;

R^{15} is selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy, alkoxy and aryloxy;

R^{16} is selected from the group consisting of hydroxy, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ and -

5 $C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} is selected from the group consisting of alkyl, cycloalkyl, aryl and heteroaryl; and

n and r are independently 1, 2, 3, or 4;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

10 23. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein:

R^6 is $-COR^{10}$ wherein R^{10} is $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ wherein:

R^{11} is hydrogen or lower alkyl;

n is 2 or 3; and

15 R^{12} is $-NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} and R^{14} are independently lower alkyl.

24. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein:

R^6 is $-COR^{10}$ wherein R^{10} is $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ wherein:

20 R^{11} is hydrogen or lower alkyl;

n is 2 or 3; and

R^{12} is $-NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} and R^{14} combine to form a group selected from -
 $(CH_2)_4$ -, $-(CH_2)_5$ -, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2$ - or $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$ -.

25 25. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein R^6 is N-(2-dimethylamino-ethyl)aminocarbonyl, N-(2-diethyl-aminoethyl)-N-methylaminocarbonyl, N-(3-dimethylamino-propyl)-aminocarbonyl, N-(2-diethylaminoethyl)-aminocarbonyl, N-(2-ethylaminoethyl)-aminocarbonyl, N-(3-ethylaminopropyl)-aminocarbonyl, or N-(3-diethylamino-propyl)aminocarbonyl.

30

26. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein R^6 is N-(2-diethylaminoethyl)aminocarbonyl or N-(2-ethylamino-ethyl)aminocarbonyl.

35 27. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein R^6 is 3-pyrrolidin-1-ylpropylaminocarbonyl, 3-morpholin-4-ylpropylamino-

carbonyl, 2-pyrrolidin-1-ylethylamino-carbonyl, 2-morpholin-4-ylethylaminocarbonyl, 2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl-aminocarbonyl, 2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl-aminocarbonyl, 3-(4-methylpiperazin-1-yl)propylamino-carbonyl or 3-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)propylamino-carbonyl.

5

28. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein R^6 is $-\text{COR}^{10}$ wherein R^{10} is $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is lower alkyl substituted with hydroxy, aryl, heteroalicyclic, heteroaryl, or carboxy.

10 29. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein R^6 is 2-triazin-1-ylpropylaminocarbonyl, 2-triazin-1-ylethylaminocarbonyl, 3-imidazol-1-ylpropylaminocarbonyl, pyridin-4-ylmethyl-aminocarbonyl, 2-pyridin-2-ylethylaminocarbonyl or 2-imidazol-1-yl ethylaminocarbonyl.

15 30. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein:

R^6 is $-\text{COR}^{10}$ wherein R^{10} is $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ wherein:

R^{11} is hydrogen or lower alkyl;

n is 2 or 3; and

20 R^{12} is $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ wherein R^{13} and R^{14} together combine to form a heterocycle.

31. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein:

R^6 is $-\text{COR}^{10}$ wherein R^{10} is $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ wherein:

25 R^{11} is hydrogen or lower alkyl;

n is 2 or 3; and

R^{12} is $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ wherein R^{13} and R^{14} together combine to form a 5, 6 or 7 atom heterocycle containing a carbonyl group and one or two nitrogen atoms within the ring.

30 32. The method of Claim 2 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein R^6 is 2-(3-oxopiperazin-1-yl)ethylaminocarbonyl, 2-(imidazolidin-1-yl-2-one)ethylaminocarbonyl, 2-(tetrahydropyrimidin-1-yl-2-one)ethylaminocarbonyl, 2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-ethylaminocarbonyl, 3-(3-oxopiperazin-1-yl)propyl-aminocarbonyl, 3-(imidazolidin-1-yl-2-one)propyl-aminocarbonyl, 3-(tetrahydropyrimidin-1-yl-2-one)-
35 propylaminocarbonyl, or 3-(2-oxopyrrolidin-1-yl)propyl-aminocarbonyl.

122

33. The method of any of the Claim 22-32 wherein the protein kinase inhibitor is a compound of Formula (I) wherein wherein:

R^5 is selected from the group consisting of hydrogen and lower alkyl; and

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, aryl, heteroaryl, and
5 $-C(O)R^{17}$, wherein R^{17} is hydroxy, lower alkyl or aryl.

34. The method of Claim 33 wherein:

R^1 is hydrogen, lower alkyl, $-C(O)NR^8R^9$, cycloalkyl or aryl;

R^2 is hydrogen, halo, lower alkoxy, cyano, aryl, $-SO_2R^{20}$, or $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$

10 wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is hydrogen, aryl or alkyl;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkoxy, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, aryl and heteroaryl; and

R^4 is hydrogen.

15 35. The method of Claim 34 wherein:

R^1 is hydrogen or phenyl;

R^2 is hydrogen, chloro, bromo, fluoro, methoxy, ethoxy, phenyl, dimethylaminosulfonyl, cyano, methylsulfonyl, ethylsulfonyl, benzylsulfonyl, 3-chlorophenyl-aminosulfonyl, carboxy, methoxy, aminosulfonyl, methylaminosulfonyl,
20 phenylaminosulfonyl, pyridin-3-yl-aminosulfonyl, dimethylaminosulfonyl, or isopropylamino-sulfonyl;

R^3 is hydrogen, methoxy, carboxy, phenyl, pyridin-3-yl, 3,4-dichlorophenyl, 2-methoxy-5-isopropylphenyl, 4-n-butylphenyl, 3-isopropylphenyl; and

R^4 is hydrogen.

25

36. The method of Claim 35 wherein:

R^1 is hydrogen;

R^2 is hydrogen, cyano, fluoro, chloro, or bromo;

R^3 is phenyl; and

30

R^4 is hydrogen.

37. The method of Claim 2 wherein:

R^1 is hydrogen, lower alkyl, $-C(O)NR^8R^9$, cycloalkyl or aryl;

35 R^2 is hydrogen, halo, lower alkoxy, cyano, aryl or $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is hydrogen, aryl or alkyl;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen, lower alkoxy, $-C(O)R^{13}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, aryl, and heteroaryl; and
 R^4 is hydrogen.

5 38. The method of Claim 2 wherein:

R^1 is hydrogen, or methyl;

R^2 is hydrogen, cyano, chloro, fluoro, or bromo;

R^3 is selected from the group consisting of hydrogen or phenyl; and

R^4 is hydrogen.

10 39. The method of Claim 2 wherein R^6 is $-COR^{10}$ wherein R^{10} is $-NR^{13}R^{14}$ wherein R^{13} is hydrogen and R^{14} is lower alkyl substituted with hydroxy, lower alkyl substituted with hydroxyalkylamino, carboxy, or $-NR^{18}R^{19}$ wherein R^{18} and R^{19} are independently hydrogen or lower alkyl.

15 40. The method of Claim 2 wherein R^6 is [2-(diethylamino)-2-hydroxy]ethylaminocarbonyl, 2-(N-ethyl-N-2-hydroxyethylamino)-ethylaminocarbonyl, carboxymethylaminocarbonyl, or 2-hydroxyethyl-aminocarbonyl.

20 41. The method of Claim 2 wherein R^6 is $-COR^{10}$ wherein R^{10} is $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ wherein R^{12} is $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$ or $-N(OH)R^{13}$ wherein R^{13} and R^{14} are independently selected from the group consisting of lower alkyl.

25 42. The method of Claim 2 wherein R^6 is 2-(N-hydroxy-N-ethylamino)ethylaminocarbonyl or 2-[$N^+(O^-)(C_2H_5)_2$]ethyl-aminocarbonyl.

43. The method of Claim 41 or 42 wherein:

R^5 is selected from the group consisting of hydrogen, or methyl; and

R^7 is selected from the group consisting of methyl, hydrogen or phenyl.

30

44. The method of Claim 2 wherein:

R^1 is hydrogen;

R^2 is hydrogen, cyano, chloro, fluoro, or bromo;

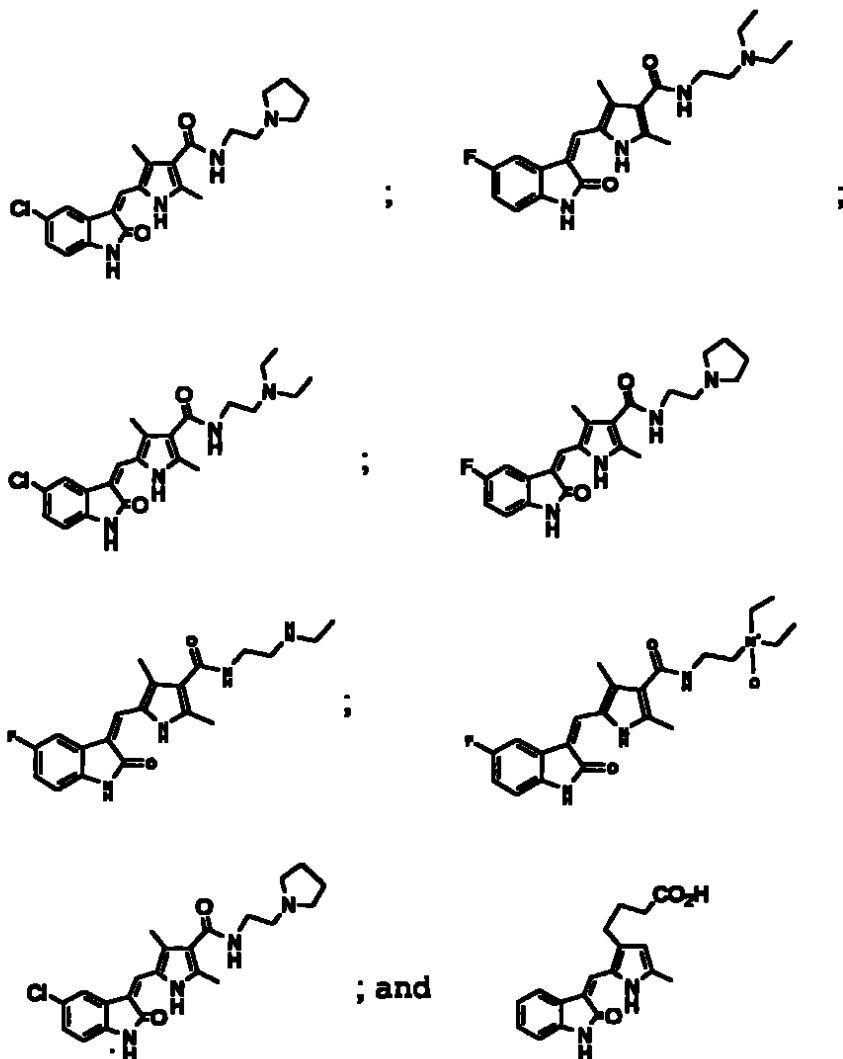
R^3 is hydrogen; and

35

R^4 is hydrogen.

123

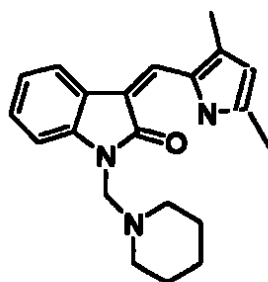
45. The method of Claim 2, wherein the kinase inhibitor is selected from the group consisting of:



5

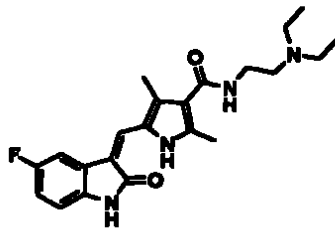
or an L-malate salt thereof.

46. The method of Claim 2, wherein the kinase inhibitor is a compound of the formula:



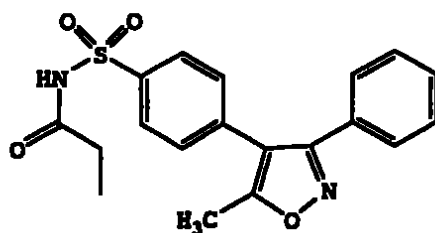
10 47. A method for the treatment or prevention of cancers comprising administering to a mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of:

a protein kinase inhibitor of the Formula (I):



5

in combination with a cyclooxygenase-2 selective inhibitor of the formula:

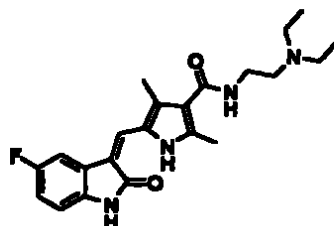


or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

10

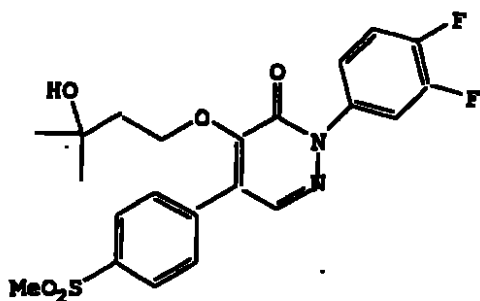
48. A method for the treatment or prevention of cancers comprising administering to a mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of:

a protein kinase inhibitor of the Formula (I):



124

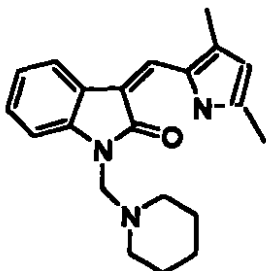
in combination with a cyclooxygenase-2 selective inhibitor of the formula:



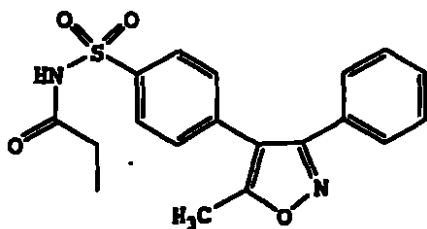
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5

49. A method for the treatment or prevention of cancers comprising administering to a mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of:
a protein kinase inhibitor of the Formula (I):



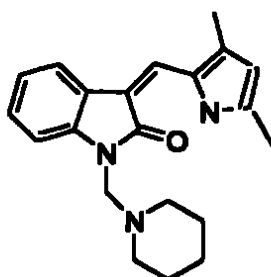
- 10 in combination with a cyclooxygenase-2 selective inhibitor of the formula:



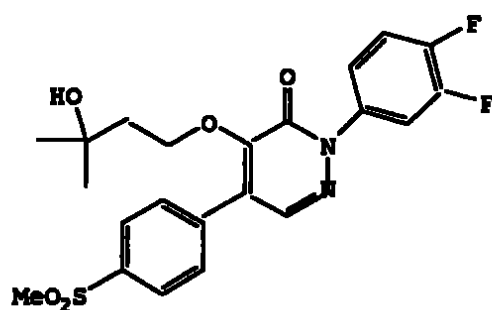
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

- 15 50. A method for the treatment or prevention of cancers comprising administering to a mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of:

a protein kinase inhibitor of the Formula (I):



5 in combination with a cyclooxygenase-2 selective inhibitor of the formula:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

125

TERAPIA DE COMBINACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

5

FUNDAMENTO DEL INVENTO

Campo del Invento

El presente invento se relaciona con métodos para el tratamiento o prevención de trastornos neoplásicos utilizando inhibidores de la proteinquinasa tirosina (tirosinquinasa) en combinación con inhibidores de la ciclooxigenasa, en particular inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2.

Estado de la técnica

Un neoplasma o tumor, es una proliferación anormal, no regulada y desorganizada del crecimiento celular. Un neoplasma es maligno, o cancerígeno, cuando tiene propiedades de crecimiento destructivo, calidad de ser invasivo y metástasis. La calidad invasiva se refiere a la diseminación local de un neoplasma mediante infiltración o destrucción de tejido circundante, típicamente abriéndose paso a través de las láminas basales que definen los límites de los tejidos, entrando a menudo de esta manera en el sistema circulatorio del cuerpo. La metástasis típicamente se refiere a la diseminación de células tumorales mediante linfáticos o vasos sanguíneos. La metástasis también se refiere a la migración de células tumorales mediante extensión directa a través de cavidades serosas, subaracnoideas u otros espacios. A través del proceso de metástasis, la migración de células tumorales hacia otras áreas del cuerpo establece neoplasmas en áreas remotas al sitio de aparición inicial.

El cáncer es ahora la segunda causa de muerte en los Estados Unidos y más de 8.000.000 de personas en los Estados Unidos han sido diagnosticadas con cáncer. En 1995, el cáncer fue responsable del 23.3% de todas las muertes en los Estados Unidos. (Ver Departamento Americano de Salud y Servicios Humanos, Centro Nacional para Estadística de Salud, Salud Estados Unidos 1996-97 y Cuadro de Lesiones 117 (1997)).

126

El cáncer no está completamente entendido a nivel molecular. Se sabe que la exposición de una célula a un carcinógeno tal como ciertos virus, ciertos químicos, o radiación, lleva a la alteración del ADN lo cual inactiva un gen "supresivo" o activa un "oncogén". Los genes supresivos son genes reguladores de crecimiento, los cuales al mutar, ya no pueden controlar el crecimiento celular. Los oncogenes son genes inicialmente normales (llamados pro-oncogenes) que mediante mutación o contexto alterado de la expresión se convierten en genes transformadores. Los productos de los genes transformadores producen crecimiento celular inapropiado. Más de veinte genes celulares normales diferentes se pueden convertir en oncogenes mediante alternación genética. Las células transformadas se diferencian de las células normales en muchas formas, incluyendo morfología celular, interacciones célula a célula, contenido de membrana, estructura citoesquelética, secreción proteica, expresión genética y mortalidad (las células transformadas pueden crecer indefinidamente).

Hoy en día, el cáncer es principalmente tratado con una o una combinación de tres tipos de terapias: cirugía, radiación, y quimioterapia. La cirugía involucra la remoción en gran parte de tejido comprometido. Mientras la cirugía algunas veces es efectiva para remover tumores localizados en ciertos sitios, por ejemplo, en el seno, colon, y piel, ésta no puede ser utilizada en tratamiento de tumores localizados en otras áreas, tales como la columna vertebral, ni en el tratamiento de condiciones neoplásicas diseminadas tales como la leucemia.

La quimioterapia involucra la alteración de la replicación celular o metabolismo celular. Se utiliza con mayor frecuencia en el tratamiento de cáncer de mama, pulmonar, y testicular.

Lo que más temen los pacientes sometidos a tratamiento para el cáncer son los efectos adversos de la quimioterapia sistémica utilizada en el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Entre estos efectos adversos, las náuseas y el vómito son los efectos secundarios más comunes y severos. Otros efectos secundarios adversos incluyen la citopenia, infección, caquexia, mucositis en pacientes que reciben altas dosis de quimioterapia con rescate de médula ósea o terapia de radiación; alopecia (pérdida de cabello); complicaciones cutáneas (ver M.D. Abeloff, Alopecia y Complicaciones

128

Cutáneas. P. 755-56. En Abeloff, M.D., Armitage, J.O., Lichter, A.S., y Niederhuber, J.E. (eds) *Oncología Clínica*. Churchill Livingstone, New York, 1992, para reacciones cutáneas a agentes de quimioterapia), tales como pruritis, urticaria, y angioedema; complicaciones neurológicas; complicaciones pulmonares y cardíacas en pacientes que reciben radiación o quimioterapia; y complicaciones reproductivas y endocrinas.

Los efectos secundarios adversos inducidos por quimioterapia significativamente impactan la calidad de vida del paciente y pueden influenciar dramáticamente en el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

Adicionalmente, los efectos secundarios adversos asociados con agentes quimioterapéuticos son por lo general la mayor toxicidad dosis limitante en la administración de estos fármacos. Por ejemplo, la mucositis, es una de las mayores toxicidades dosis limitante para varios agentes anticancerígenos, incluyendo los agentes citotóxicos antimetabolito 5-FU, metotrexato, y antibióticos antitumorales, tales como doxorubicina. Si son severos, muchos de estos efectos secundarios inducidos por quimioterapia pueden llevar a hospitalización, o requerir tratamiento con analgésicos para el tratamiento de dolor.

Los efectos secundarios adversos inducidos mediante agentes quimioterapéuticos y terapia de radiación se han vuelto de gran importancia para el manejo clínico de pacientes con cáncer.

Actualmente, los científicos están buscando tratar cánceres mediante el uso de agentes antiangiogénicos. Se cree que la angiogénesis es el mecanismo mediante el cual los tumores obtienen los nutrientes necesarios para crecer y regarse hacia (metástasis) otros lugares en el cuerpo. Los agentes antiangiogénicos interfieren con estos procesos y destruyen o controlan los tumores.

Por ejemplo, la patente U.S. No. 5.854.205 describe una proteína de endostatina aislada que es un inhibidor de la proliferación celular endotelial y la angiogénesis; la Patente U.S. 5.843.925 describe un método para inhibir la angiogénesis y proliferación celular endotelial utilizando una 7-[amino sustituido]-9-[(glicidoamido sustituido]-6-dimetil-6-deoxitetraciclina; la patente U.S. No. 5.861.372 describe el uso de un inhibidor endotelial agregado, la angiostatina, y su uso para inhibir la angiogénesis,

128

PCT/GB97/00650 describe el uso de derivados de la cinolina para utilizar en la producción de un efecto reductor de la permeabilidad vascular y/o antiangiogénico; Tai-Ping, D.

describe terapias antiangiogénicas potenciales, ver Trends Pharmacol. Sci. 16, No. 2, 57-66, 1995; LODE, H. describe como una sinergia entre un antagonista de integrina alfa-v

5 antiangiogénica y una proteína de fusión anticuerpo-citoquina erradica la metástasis tumoral espontánea, ver Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 96(4), 1591-1596, 1999; Giannis, A. describe los antagonistas de integrinas y otros compuestos de bajo peso molecular como inhibidores de la angiogénesis, ver Nuevos fármacos en terapia de cáncer. Angew. Chem.

Int. Ed. Engl. 36(6), 588-590, 1997; WO 97/41, 844 describe un método para utilizar

10 combinaciones de compuestos angioestáticos para la prevención y/o tratamiento de neovascularización en pacientes humanos; WO 98/22 101 describe un método para utilizar [pirozol-1-il]bencenosulfonamidas como agentes anti-angiogénicos; y la Patente US 5.792.783 describe el uso de 3-heteroaril-2-indolinona que son inhibidores de la proteinquinasa y agentes antiangiogénicos para el tratamiento de varios cánceres.

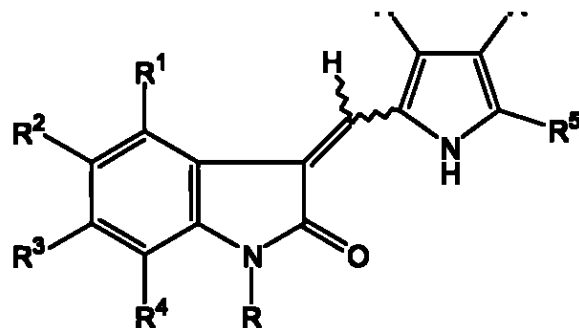
15 Recientemente, se ha reportado que el tratamiento de cáncer colorectal con un inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2, específicamente celecoxib®, en combinación con un inhibidor ART-2, específicamente Herceptin®, es más efectivo que cuando cualquier agente es utilizado de manera independiente. Por consiguiente, existe la necesidad de descubrir nuevas combinaciones de agentes quimioterapéuticos que al usarse
20 conjuntamente sean más eficaces que cuando se utilicen de manera separada. El presente invento satisface esta necesidad.

RESUMEN DEL INVENTO

En un aspecto, este invento está dirigido a un método de tratamiento o prevención
25 de cánceres que comprende la administración a un mamífero en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de:

(I)

un inhibidor de la proteinquinasa de la fórmula (I):



729

10 en donde:

R es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, piperazin-1-ilmetilo, 4-metilpiperazin-1-ilmetilo, piperidin-1-ilmetilo, 2-hidroximetilpirrolidin-1-ilmetilo, 2-carboxipirrolidin-1-ilmetilo, y pirrolidin-1-ilmetilo;

15 R¹ es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxilo, alcoxilo, -C(O)NR⁶R⁹, -NR¹³R¹⁴, -(CO)R¹⁵, y -(CH₂)_rR¹⁶;

R² es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, alquilo sustituido, trihalometilo, hidroxilo, alcoxilo, ciano, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -C(O)R¹⁵, arilo, heteroarilo, y -S(O)₂NR¹³R¹⁴;

20 R³ es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, trihalometilo, hidroxilo, alcoxilo, arilo, heteroarilo, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³S(O)₂R¹⁴, -S(O)₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -(CO)R¹⁵, y -SO₂R¹⁹;

R⁴ es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, hidroxilo, alcoxilo, y -NR¹³R¹⁴;

25 R⁵ es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y -C(O)R¹⁰;

R⁶ es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y -C(O)R¹⁰;

30 R⁷ es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo, -C(O)R¹⁷, y -C(O)R¹⁰, y -C(O)R¹⁰; siempre y cuando R es hidrógeno entonces al menos uno entre R⁵, R⁶ y R⁷ es -C(O)R¹⁹; o

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

R^8 y R^9 son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y arilo;

R^{10} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, - $N(R^{11})(alquilen) nR^{12}$ en donde el grupo alquilen es opcionalmente substituido con un grupo hidroxilo, y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, y alquilo sustituido;

R^{12} es seleccionado del grupo que consta de $-NR^{13}R^{14}$, hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, $-N^+(O^-)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$, y $-NHC(O)R^{18}$ (en donde R^{18} es alquilo, alquilo sustituido, haloalquilo, o aralquilo);

R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, cianoalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo y heteroarilo; o

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

R^{15} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo y ariloxilo;

R^{16} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, $-NR^{13}R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, y $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} es seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, arilo y heteroarilo;

R^{19} es seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, arilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo; y

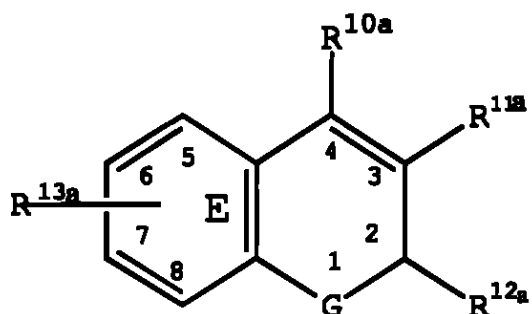
n y r son independientemente 1, 2, 3, ó 4;

en combinación con un inhibidor de ciclooxigenasa;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Preferiblemente, el inhibidor de la proteinquinasa de la fórmula (I) se utiliza en combinación con un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 seleccionado del grupo que consta de:

(i) un compuesto de la Fórmula (II):



en donde:

G es seleccionado del grupo que consta de O, S, y $-NR^a$ en donde R^a es hidrógeno o alquilo;

5 R^{10a} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y arilo;

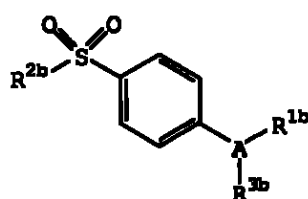
R^{11a} es seleccionado del grupo que consta de carboxilo, alquilo, aralquilo, aminocarbonilo, alquilsulfonilaminocarbonilo, y alcoxicarbonilo;

10 R^{12a} es seleccionado del grupo que consta de haloalquilo, alquilo, aralquilo, cicloalquilo y arilo opcionalmente sustituido con uno o más radicales seleccionados de alquiltio, nitro y alquilsulfonilo; y

R^{13a} es uno o más radicales independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, aralquilo, alcóxido, ariloxilo, heteroariloxilo, haloalquilo, haloalcóxido, alquilamino, arilamino, aralquilamino, heteroarilamino, heteroarilalquilamino, nitro, amino, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, heteroarilaminosulfonilo, aralquilaminosulfonilo, heteroaralquilaminosulfonilo, heterociclosulfonilo, alquilsulfonilo, hidroxiarilcarbonilo, nitroarilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, aralquilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, arilcarbonilo, aminocarbonilo, y alquilcarbonilo;

ó R^{13a} junto con el anillo E forma un anillo de naftilo; o

20 (ii) un compuesto de la fórmula (III):



(III)

en donde:

A es seleccionado del grupo que consta de heterociclilo no saturado o parcialmente no saturado y anillos carbocíclicos no saturados o parcialmente no saturados;

5 R^{1b} es seleccionado del grupo que consta de heterociclilo, cicloalquilo, cicloalquenilo y arilo, en donde R^{1b} es opcionalmente substituido en una posición sustituible con uno o más radicales independientemente seleccionados de alquilo, haloalquilo, ciano, carboxilo, alcoxicarbonilo, hidroxilo, hidroxialquilo, haloalcoxilo, amino, alquilamino, arilamino, nitro, alcoxialquilo, alquilsulfinilo, halo, alcoxilo, y
10 alquiltio;

R^{2b} es seleccionado del grupo que consta de metilo y amino; y

R^{3b} es seleccionado del grupo que consta de un radical seleccionado de hidrógeno, halo, alquilo, alquenilo, alquinilo, oxo, ciano, carboxilo, cianoalquilo, heterociclixilo, alquilo, alquiltio, alquilcarbonilo, cicloalquilo, arilo, haloalquilo, heterociclilo,
15 cicloalquenilo, aralquilo, heterociclilalquilo, acilo, alquiltioalquilo, hidroxialquilo, alcoxicarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, aralquenilo, alcoxialquilo, ariltioalquilo, ariloxialquilo, aralquiltioalquilo, aralcoxialquilo, alcoxialalcoxialquilo, alcoxicarbonilalquilo, aminocarbonilo, aminocarbonilalquilo, alquilaminocarbonilo, N-arilaminocarbonilo, N-alquil-N-arilaminocarbonilo, alquilaminocarbonilalquilo,
20 carboxialquilo, alquilamino, N-arilamino, N-aralquilamino, N-alquil-N-aralquilamino, N-alquil-N-arilamino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, N-arilaminoalquilo, N-aralquilaminoalquilo, N-alquil-N-aralquilaminoalquilo, N-alquil-N-arilaminoalquilo, ariloxilo, aralcoxilo, ariltio, aralquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo, N-arilaminosulfonilo, arilsulfonilo, y N-alquil-N-arilaminosulfonilo;
25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Preferiblemente, los anteriores compuestos son administrados como una composición farmacéutica que comprende uno o más de los anteriores compuestos y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Específicamente, los agentes terapéuticos de este invento se pueden formular como composiciones separadas las cuales son administradas al

mismo tiempo o en momentos diferentes, o los agentes terapéuticos se pueden administrar como una composición única.

Los métodos del presente invento son útiles para el tratamiento o prevención de trastornos de neoplasia incluyendo melanoma lentiginoso acral, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma cístico adenoide, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartholin, carcinoma celular basal, carcinomas de las glándulas bronquiales, carcinoides, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma cavernoso, condosarcoma, papiloma/carcinoma de plexo coroide, carcinoma de células claras, cistadenoma, tumor de seno endodermal, hiperplasia endometrial, sarcoma estrómico endometrial (estromatosis), adenocarcinoma endometrioide, ependimal, epitelioide, sarcoma de Ewing, hepatocarcinoma fibromelar, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de células germinales, glioblastoma, glucagonoma, hemangiblastomas, hemangioendotelioma, hemangiomas, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinoma, neoplasia intraepitelial, neoplasia celular escamosa interepitelial, carcinoma celular escamoso invasivo, carcinoma de células grandes, leiomiosarcoma, melanoma léntigo maligno, melanoma maligno, tumores mesoteliales malignos, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, carcinoma meníngeo, mesotelial, metastático, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, carcinoma avenocelular, osteosarcoma oligodendrogial, polipéptido pancreático, adenocarcinoma seroso papilar, célula pineal, tumores pituitarios, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, carcinomas de tejido blando, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, melanoma extensivo superficial, carcinoma no diferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrucoso, vipoma, carcinoma bien diferenciado, y tumor de Wilm.

Los métodos del presente invento proporcionan uno o más beneficios. Uno de los beneficios es que las composiciones, agentes y terapias del presente invento son administrados en combinación con una dosis baja, es decir, una dosis menor que aquella

924

convencionalmente utilizada en situaciones clínicas para cada uno de los componentes individuales administrados solos.

Un beneficio por la reducción de la dosis de los compuestos, composiciones, agentes y terapias del presente invento administrados a un mamífero incluye una
5 disminución en la incidencia de efectos adversos asociados con dosis altas. Por ejemplo, al reducir la dosis de un agente quimioterapéutico tal como metotrexato, se producirá una reducción en la frecuencia y severidad de náuseas y vómito en comparación con las dosis altas. Beneficios similares son contemplados cuando un inhibidor de la proteínquinasa del presente invento es utilizado en combinación con un inhibidor de la ciclooxigenasa, en
10 particular un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2.

Al reducir la incidencia de efectos adversos, se contempla una mejora en la calidad de vida de un paciente sometido al tratamiento para el cáncer. Beneficios adicionales al reducir la incidencia de efectos adversos incluyen una mejora en el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente, una reducción en el número de hospitalizaciones
15 necesarias para el tratamiento de efectos adversos, y una reducción en la administración de agentes analgésicos necesarios para tratar el dolor asociado con los efectos adversos.

Otro beneficio que es contemplado es que la inhibición de los tumores es mayor cuando se administra un inhibidor de la proteínquinasa en combinación con un inhibidor de la ciclooxigenasa, preferiblemente un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 que cuando
20 cualquiera de estos agentes es administrado solo.

El presente invento además incluye kits que comprenden un inhibidor de la COX-2 y un inhibidor de la proteínquinasa de la fórmula (I).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE INVENTO

Definiciones

A menos que se indique lo contrario los siguientes términos utilizados en la especificación y reivindicaciones tienen los significados ilustrados a continuación:

“Alquilo” se refiere a un radical de hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y cadena ramificada de 1 a 20 átomos de carbono (siempre y
30 cuando un rango numérico; ejemplo “1-20”, sea declarado en la presente, esto significa que

el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener un átomo de carbono, dos átomos de carbono, tres átomos de carbono, etc. hasta e incluyendo 20 átomos de carbono). Los grupos alquilo que contienen entre 1 y 4 átomos de carbono son conocidos como grupos alquilo inferiores. Cuando tales grupos alquilo inferiores carecen de sustituyentes, se conocen como grupos alquilo inferiores. Más preferiblemente, un grupo alquilo es un alquilo de tamaño medio con entre 1 y 10 átomos de carbono ejemplo, metilo, etilo, propilo, 2-propilo, n-butilo, *iso*-butilo, *tert*-butilo, pentilo, y similares.

“Alquilo sustituido” significa que el grupo alquilo tal como se definió anteriormente es sustituido con uno o más, más preferiblemente 1 a 3, aún más preferiblemente uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consta de halo, hidroxilo, alcoxilo inferior, arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente uno, dos o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, ariloxilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente uno, dos o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, heteroarilo de 6 miembros con entre 1 y 3 átomos de nitrógeno en el anillo, los carbonos en el anillo siendo opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente uno, dos o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, heteroarilo de cinco miembros con entre uno y tres heteroátomos seleccionados del grupo que consta de nitrógeno, oxígeno y azufre, el carbono y los átomos de nitrógeno en el grupo siendo opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente 1,2 o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, grupo heterocíclico de cinco o seis miembros con entre uno y tres heteroátomos seleccionados del grupo que consta de nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno en el grupo siendo opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente uno, dos o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, mercapto, (alquilo inferior)tio, ariltio opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente uno, dos o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos

halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, 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 $-NR^{18}R^{19}$, en donde R^{18} y R^{19} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, trihalometilo, (C_3-C_6) cicloalquilo, alquenilo inferior, alquinilo inferior y alilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente 1,2 o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior.

Preferiblemente, el grupo alquilo es sustituido con uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consta de hidroxilo, grupo heteroalíclico de cinco o seis miembros con entre uno y tres heteroátomos seleccionados del grupo que consta de nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno (si están presentes) en el grupo siendo opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente uno, dos o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, heteroarilo de cinco miembros teniendo entre uno y tres heteroátomos seleccionados del grupo que consta de nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno en el grupo siendo opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente uno, dos o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, heteroarilo de seis miembros teniendo entre uno y tres átomos de nitrógeno en el anillo, los carbonos en el anillo siendo opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente uno, dos o tres grupos los cuales son independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, o $-NR^{18}R^{19}$, en donde R^{18} y R^{19} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior. Aún más preferiblemente el grupo alquilo es sustituido con uno o dos sustituyentes los cuales son independientemente de cada uno de los demás hidroxilo, dimetilamino, etilamino, dietilamino, dipropiloamino, pirrolidino, piperidino, morfolinilo, piperazino, alquilpiperazino 4-inferior, fenilo, imidazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, oxazolilo, triazinilo, y similares.

"Cicloalquilo" se refiere a un anillo monocíclico enteramente de carbón de 3 a 8 miembros, un anillo bicíclico fusionado enteramente de carbón de 5 miembros/6-miembros o 6 miembros/6 miembros o un grupo de anillos fusionados multicíclicos (un sistema cíclico fusionado significa que cada anillo en el sistema comparte un par adyacente de átomos de carbono con cada uno de los demás anillos en el sistema) en donde uno o más de los anillos puede contener uno o más enlaces dobles pero ninguno los anillos tiene un sistema electrones pi completamente conjugado.

Ejemplos, sin limitación, de grupos cicloalquilo son ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexadieno, adamantano, cicloheptano, cicloheptatrieno, y similares.

"Cicloalquilo sustituido" significa un grupo cicloalquilo tal como se definió anteriormente que es sustituido con uno o más, más preferiblemente uno o dos sustituyentes, independientemente seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, trihaloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxilo inferior, arilo opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente uno o dos grupos independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, ariloxilo opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente uno o dos grupos independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, heteroarilo de seis miembros con entre uno y tres átomos de nitrógeno en el anillo, los carbonos en el anillo siendo opcionalmente sustituidos con uno o más, preferiblemente uno o dos grupos independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, heteroarilo de cinco miembros con entre uno y tres heteroátomos seleccionados del grupo que consta de nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno del grupo siendo opcionalmente sustituidos con uno o más, preferiblemente uno o dos grupos independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, grupo heteroalíclico de 5 o 6 miembros con entre uno y tres heteroátomos seleccionados del grupo que consta de nitrógeno, oxígeno y azufre, los átomos de carbono y nitrógeno (si están presentes) en el grupo siendo opcionalmente sustituidos con uno o más, preferiblemente uno o dos grupos independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, mercapto,

(alquilo inferior)tio, alquiltio opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente uno o dos grupos independientemente de cada uno de los demás grupos halo, hidroxilo, alquilo inferior o alcoxilo inferior, 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 $-NR^{18}R^{19}$ son tal como se definieron anteriormente.

"Alquenilo" se refiere un grupo alquilo inferior, tal como se definió en la presente, que consta de al menos dos átomos de carbono y al menos un enlace doble carbono-carbono. Ejemplos representativos incluyen, pero no están limitados a, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-, 2-, o 3-butenilo, y similares.

"Alquinilo" se refiere a un grupo alquilo inferior, tal como se definió en la presente, que consta de al menos dos átomos de carbono y al menos un enlace triple carbono-carbono. Ejemplos representativos incluyen, pero no están limitados a etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-, 2-, o 3-butinilo, y similares.

"Ariilo" se refiere a un grupo monocíclico de carbono o policíclico de anillo fusionado (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono de 1 a 12 átomos de carbono teniendo un sistema electrones pi completamente conjugado. Ejemplos, sin limitación, de grupos ariilo son fenilo, naftalenilo y antracenilo. El grupo ariilo puede ser sustituido o no sustituido. Cuando es sustituido, el grupo sustituido es preferiblemente uno o más, más preferiblemente uno, dos o tres, aún más preferiblemente uno o dos, independientemente seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, trihaloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxilo inferior, mercapto, (alquilo inferior)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} tal como se definieron anteriormente. Preferiblemente, el grupo ariilo es oficialmente sustituido con uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alquilo inferior, trihaloalquilo, hidroxilo, mercapto, ciano, N-amido, mono o dialquilamino, carboxilo, o sulfonamido.

"Heteroarilo" se refiere a un grupo monocíclico o fusionado (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos) de 5 a 12 átomos cíclicos que contienen uno, dos, o

139

tres heteroátomos cíclicos seleccionados de N, O, o S, los restantes átomos cíclicos siendo C, y, además, con un sistema electrones pi completamente conjugado. Ejemplos, sin limitación, de grupos heteroarilo no sustituidos son pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina, purina y carbazol. El grupo

5 heteroarilo puede ser sustituido o no sustituido. Cuando es sustituido, el grupo sustituido es preferiblemente uno o más, más preferiblemente uno, dos, o tres, aún más preferiblemente uno o dos, independientemente seleccionado del grupo que consta de alquilo inferior, trihaloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxilo inferior, mercapto, (alquilo inferior)tio, ciano, acilo, tioacilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido,

10 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} tal como se definió anteriormente. Preferiblemente, el grupo heteroarilo es opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alquilo inferior, trihaloalquilo, hidroxilo, mercapto, ciano, N-amido, mono o dialquilamino, carboxilo, o N-sulfonamido.

15 "Heteroalíclico" se refiere a un grupo monocíclico o fusionado que tiene en el anillo de 5 a 9 átomos cíclicos en los cuales uno o dos átomos cíclicos son heteroátomos seleccionados de N, O, o $S(O)_n$ (donde n es un entero entre 0 y 2), los restantes átomos cíclicos siendo C. Los anillos también pueden tener uno o más enlaces dobles. Sin embargo, los anillos no tienen un sistema electrones pi completamente conjugado.

20 Ejemplos, sin limitación, de grupos heteroalíclicos no sustituidos son pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, tiomorfolino, homopiperazino, y similares. El anillo heteroalíclico puede ser sustituido o no sustituido. Cuando es sustituido, los grupos sustituidos preferiblemente son uno o más, más preferiblemente uno, dos o tres, aún más preferiblemente uno o dos, independientemente seleccionados del grupo que consta de

25 alquilo inferior, trihaloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxilo inferior, mercapto, (alquilo inferior)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} tal como se definió anteriormente. Preferiblemente, el grupo heteroalíclico es opcionalmente sustituido con uno o dos

1210

sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alquilo inferior, trihaloalquilo, hidroxilo, mercapto, ciano, N-amido, mono o dialquilamino, carboxilo, o N-sulfonamido.

“Heterociclo” significa un radical cíclico saturado de tres a ocho átomos cíclicos en el cual uno o dos átomos cíclicos son heteroátomos seleccionados de N, O, o S(O)_n (donde

5 n es un entero entre 0 y 2), los restantes átomos cíclicos siendo C, donde uno o dos átomos de C pueden opcionalmente ser reemplazados por un grupo carbonilo. El anillo heterociclilo puede opcionalmente ser sustituido independientemente con 1,2, o tres sustituyentes seleccionados de alquilo inferior opcionalmente sustituido (sustituidos con uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados de carboxilo o éster),

10 haloalquilo, ciano, halo, nitro, ciano, hidroxilo, alcoxilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, aralquilo, heteroaralquilo, -COR (donde R es alquilo) o -COOR donde R es (hidrógeno o alquilo). Más específicamente el término heterociclilo incluye, pero no está limitado a, tetrahidropirranilo, 2,2-dimetilo-1,3-dioxolano, piperidino, N-metilpiperidin-3-ilo, piperazino, N-metilpirrolidin-3-ilo, 3-pirrolidino, morfolino, tiomorfolino,

15 tiomorfolino-1-óxido, tiomorfolino-1,1-dióxido, 4-etiloxicarbonilpiperazino, 3-oxopiperazino, 2-imidazolidona, 2-pirrolidinona, 2-oxohomopiperazino, tetrahidropirimidin-2-ona, y derivados de los mismos. Preferiblemente, el grupo heterociclo es opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido con carboxilo, éster hidroxilo, mono o

20 dialquilamino.

“Hidroxilo” se refiere a un grupo -OH.

“Alcoxilo” se refiere tanto a un grupo -O-(alquilo) como a un grupo -O-(cicloalquilo). Ejemplos representativos incluyen, pero no están limitados a, ej-, metoxilo, etoxilo, propoxilo, butoxilo, ciclopropiloxilo, ciclobutiloxilo, ciclopentiloxilo,

25 ciclohexiloxilo, y similares.

“ariloxilo” se refiere tanto a un grupo -O-arilo como a un grupo -O-heteroarilo, tal como se definió en la presente. Ejemplos representativos incluyen, pero no están limitados a, fenoxilo, piridiniloxilo, furaniloxilo, tieniloxilo, pirimidiniloxilo, piraziniloxilo, y similares, y derivados de los mismos.

30 “Mercapto” se refiere a un grupo -SH.

11/11

“Alquiltio” se refiere tanto a un grupo S-alquilo como a un grupo S-cicloalquilo. Ejemplos representativos incluyen, pero no están limitados a, ej., metiltio, etiltio, propiltio, butiltio, ciclopropiltio, ciclobutiltio, ciclopentiltio, ciclohexiltio, y similares.

5 “Ariltio” se refiere tanto a un grupo S-arilo como a un grupo S-heteroarilo, tal como se definió en la presente.

Ejemplos representativos incluyen, pero no están limitados a, feniltio, piridiniltio, furaniltio, tiantio, pirimidiniltio, y similares y derivados de los mismos.

10 “Acilo” se refiere a un grupo $-C(O)-R''$, donde R'' es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, trihaloalquilo, cicloalquilo, arilo opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente uno, dos, o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, trihalometilo, alcoxilo inferior, halo y grupos $-NR^{18}R^{19}$, heteroarilo (unido a través de un carbono cíclico) opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente uno, dos, o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, trihaloalquilo, alcoxilo inferior, halo y grupos $-NR^{18}R^{19}$ y

15 heteroalíclico (unido a través de un carbono cíclico) opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente uno, dos, o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, trihaloalquilo, alcoxilo inferior, halo y grupos $-NR^{18}R^{19}$. Grupos acilo representativos incluyen pero no están limitados a, acetilo, trifluoroacetilo, benzoilo, y similares.

20 “Aldehído” se refiere a un grupo acilo en el cual R'' es hidrógeno.

“Tioacilo” se refiere a un grupo $-C(S)-R''$, con R'' tal como se definió en la presente.

“Éster” se refiere a un grupo $-C(O)O-R''$ con R'' tal como se definió en la presente excepto que R'' no puede ser hidrógeno.

25 Grupo “acetilo” se refiere a un grupo $-C(O)CH_3$.

Grupo “halo” se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente flúor o cloro.

Grupo “trihalometilo” se refiere a un grupo $-CX_3$ en donde X es un grupo halo tal como se definió en la presente.

30 Grupo “trihalometanosulfonilo” se refiere a un grupo $X_3CS(=O)_2-$ con X tal como se definió anteriormente.

442

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

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

5 Grupo "etilenodioxilo" se refiere a un $-OCH_2CH_2O-$ donde los dos átomos de oxígeno 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} tal como se definió en la presente.

"N-sulfonamido" se refiere a un grupo $-NR^{18}S(O)_2R^{19}$, con R^{18} y R^{19} tal como se definió en la presente.

10 Grupo "O-carbamilo" se refiere a un grupo $-OC(O)NR^{18}R^{19}$ con R^{18} y R^{19} tal como se definió en la presente.

"N-carbamilo" se refiere a un grupo $R^{18}OC(O)NR^{19}$, con R^{18} y R^{19} tal como se definió en la presente.

15 "O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo $-OC(S)NR^{18}R^{19}$ con R^{18} y R^{19} tal como se definió en la presente.

"N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo $R^{18}OC(S)NR^{19}$ con R^{18} y R^{19} tal como se definió en la presente.

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

20 "C-amido" se refiere a un grupo $-C(O)NR^{18}R^{19}$ con R^{18} y R^{19} tal como se definió en la presente.

"N-amido" se refiere a un grupo $R^{18}C(O)NR^{19}$, con R^{18} y R^{19} tal como se definió en la presente.

"Nitro" se refiere a un grupo $-NO_2$.

25 "Haloalquilo" significa un alquilo, preferiblemente alquilo inferior tal como se definió anteriormente que es sustituido con uno o más átomos halo iguales o diferentes, ej., $-CH_2Cl$, $-CF_3$, $-CH_2CF_3$, $-CH_2CCl_3$, y similares.

"Aralquilo" significa alquilo, preferiblemente alquilo inferior tal como se definió anteriormente el cual es sustituido con un grupo arilo tal como se definió anteriormente, ej., $-CH_2$ fenilo, $-(CH_2)_2$ fenilo, $-(CH_2)_3$ fenilo, $CH_3CH(CH_3)CH_2$ fenilo, y similares y derivados
30 de los mismos.

Grupo "heteroaralquilo" significa alquilo, preferiblemente alquilo inferior tal como se definió anteriormente el cual es sustituido con un grupo heteroarilo, ej., -CH₂piridinilo, - (CH₂)₂pirimidinilo, - (CH₂)₃imidazolilo, y similares, y derivados de los mismos.

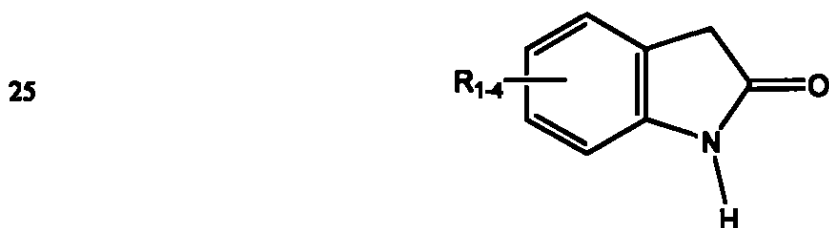
"Monoalquilamino" significa un radical -NHR donde R es un grupo cicloalquilo o alquilo no sustituido tal como se definió anteriormente, ej., metilamino, (1-metiletil)amino, ciclohexilamino, y similares.

"Dialquilamino" significa un radical -NRR donde cada R es independientemente un grupo cicloalquilo o alquilo no sustituido tal como se definió anteriormente, ej., dimetilamino, dietilamino, (1-metiletil)etilamino, ciclohexilmetilamino, ciclopentilmetilamino, y similares.

"Cianoalquilo" significa alquilo, preferiblemente alquilo inferior tal como se definió anteriormente, el cual es sustituido con 1 o 2 grupos ciano.

"Opcional" o "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia subsecuentemente descrito puede, pero no necesita ocurrir, y que la descripción incluye instancias donde el evento o circunstancia ocurre, e instancias en las cuales no ocurre. Por ejemplo, "grupo heterociclo opcionalmente sustituido con un grupo alquilo" significa que el alquilo puede, pero no necesita estar presente, y la descripción incluye situaciones donde el grupo heterociclo es sustituido por un grupo alquilo y situaciones donde el grupo heterociclo no es sustituido con el grupo alquilo.

Los términos "2-indolinona", "indolin-2-ona" y "2-oxindol" son utilizados intercambiabilmente en la presente para referirse a una molécula con la estructura química:



El término "pirrol" se refiere una molécula con la estructura química:



12/11/24

Los términos "2-indolinona pirrol- sustituida" y "3-pirrolidenil-2-indolinona" se utilizan intercambiabilmente en la presente para referirse a un compuesto químico con la estructura general mostrada en la fórmula (I).

Los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o la disposición de sus átomos en espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en espacio se denominan "estereoisómeros".

Los estereoisómeros que son imágenes no invertidas entre sí se denominan "diastereoisómeros" y aquellos que son imágenes invertidas no superpuestas entre si se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero se puede caracterizar por la configuración absoluta de su centro asimétrico y es descrito por las reglas de secuenciamiento R- y S- de Cahn y Prelog, o mediante la manera que la molécula rota el plano de luz polarizada y denominado como dextrorrotatorio o levorrotatorio (es decir, como isómeros (+) o (-), respectivamente). Un compuesto quiral puede existir ya sea como un enantiómero individual o como una mezcla del mismo. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se llama una "mezcla racémica"

Los compuestos de este invento pueden poseer uno o más centros asimétricos; por lo tanto tales compuestos pueden ser producidos como estereoisómeros (R)- o (S)- individuales o como mezclas de los mismos. Por ejemplo, si el sustituyente R⁶ en un compuesto de la fórmula (I) es 2-hidroxietilo, entonces el carbono al cual el grupo hidroxilo está unido es un centro asimétrico y por lo tanto el compuesto la fórmula (I) puede existir como un estereoisómero (R)- o (S)-. A menos que se indique lo contrario, la descripción o denominación de un compuesto particular en la especificación y reivindicaciones pretende incluir tanto los enantiómeros individuales como las mezclas, racémicas u otras, de los mismos. Los métodos para la determinación de estereoquímica y la separación de estereoisómeros son bien conocidos en el estado de la técnica (ver discusión en Capítulo 4

MS

de "Química Orgánica Avanzada", cuarta edición J. March. John Wiley e Hijos, Nueva York, 1992).

Los compuestos del presente invento pueden exhibir fenómenos de tautomerismo e isomerismo estructural. Por ejemplo, los compuestos de la fórmula (I) descritos en la presente pueden adoptar una configuración E o Z cerca del enlace doble que conecta la fracción de 2-indolinona a la fracción de pirrol o estos pueden ser una mezcla de E y Z. Este invento incluye cualquier forma isomérica tautomérica o estructural y mezclas de la misma que poseen la capacidad para modular la actividad RTK, CTK y/o STK y no se limita a cualquier forma tautomérica o estructural.

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

Los compuestos del presente invento también pueden actuar como un profármaco. Un "profármaco" se refiere a un agente el cual es convertido en el fármaco precursor *in vivo*. Y los profármacos a menudo son útiles puesto que, en algunas situaciones, estos pueden ser administrados con mayor facilidad que el fármaco precursor. Estos pueden, por ejemplo, ser biodisponibles mediante administración oral mientras que el fármaco precursor no. El profármaco también puede tener solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas en comparación con el fármaco precursor. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un compuesto del presente invento el cual es administrado como un éster (el "profármaco") para facilitar la transmisión a través de una membrana celular donde las solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad pero luego es metabólicamente hidrolizado al ácido carboxílico, la entidad activa, una vez en el interior de la célula donde las solubilidad en agua es benéfica.

Un ejemplo adicional de un profármaco puede ser un polipéptido corto, por ejemplo, sin limitación, un polipéptido de 2-10 aminoácidos, unido a través de un grupo amino terminal a un grupo carboxilo de un compuesto de este invento donde el polipéptido es

hidrolizado o metabolizado in vivo para liberar la molécula activa. Los profármacos de un compuesto de la fórmula (I) están dentro del alcance de este invento.

Adicionalmente, se contempló que un compuesto de la fórmula (I) sería metabolizado por enzimas en el cuerpo del organismo tal como un ser humano para generar un metabolito que pueda modular la actividad de las proteinquinasas. Tales metabolitos están dentro del alcance del presente invento.

Como se utiliza en la presente, un "vehículo fisiológicamente/farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado.

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia inerte agregada a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y glicoles de polietileno.

Como se utiliza en la presente, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad biológica y propiedades del compuesto precursor. Tales sales incluyen:

(i) sal de adición ácida la cual es obtenida mediante la reacción de la base libre del compuesto precursor con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido hidrobromico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, y ácido perclórico y similares, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido málico (D) o (L), ácido maléico, ácido metanosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido *p*-toluensulfónico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico y similares, preferiblemente ácido clorhídrico o ácido málico (L) tal como la sal de L-malato de (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico; o

(2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto precursor es reemplazado ya sea por un ión metálico, ej., un ión de metal alcalino, un ión alcalinotérreo; o enlaces coordinados con una base orgánica. Iones de ejemplo incluyen aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc en sus valencias usuales. Bases orgánicas preferidas

147

incluyen aminas terciarias protonadas y cationes de amonio cuaternario, incluyendo en parte, trimetilamina, dietilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaina.

5 **"Método"** se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea dada incluyendo, pero sin limitar a, aquellas formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las ciencias químicas, farmacéuticas, biológicas, bioquímicas y médicas.

10 **"Tratar" y "tratamiento"** se refiere a cualquier proceso, acción, aplicación, terapia, o similares, en donde un mamífero, incluyendo un ser humano, es sometido a asistencia médica con el objeto de mejorar la condición del mamífero, directa o indirectamente. Con respecto particularmente al cáncer, estos términos simplemente significan que la expectativa de vida de un individuo afectado por un cáncer será aumentada o que uno o más *síntomas de la enfermedad desaparecerán. Esto se puede monitorear mediante la aparición*
15 retardada de tumores primarios o secundarios, desarrollo lento de tumores primarios o secundarios, ocurrencia disminuida de tumores primarios o secundarios, severidad retardada o disminuida de efectos secundarios de la enfermedad, crecimiento tumoral detenido y regresión de tumores, entre otros.

20 El término **"prevención"** incluye cualquiera la prevención del comienzo de neoplasia clínicamente evidente del todo o la prevención del comienzo de una etapa pre-clínicamente evidente de neoplasia en individuos en riesgo. Esta definición también incluye la prevención de iniciación de células malignas o detener o invertir la progresión de células pre-malignas a células malignas. Esto incluye tratamiento profiláctico de aquellos individuos en riesgo de desarrollar la neoplasia.

25 La frase **"terapéuticamente efectivo"** pretende calificar la cantidad de cada agente que logrará el objetivo de mejoría en la severidad de la enfermedad neoplásica y la frecuencia de enfermedad neoplásica durante el tratamiento de cada agente por sí mismo, mientras evita efectos secundarios adversos típicamente asociados con terapias alternativas.

30 Un **"efecto terapéutico"** o **"cantidad efectiva terapéutica"** pretende calificar la cantidad de agente anticancerígeno requerido para aliviar en alguna medida uno o más de

148

los síntomas de un trastorno de neoplasia, incluyendo, pero sin limitar a: 1) reducción del número de células cancerígenas; 2) reducción en el tamaño del tumor; 3) inhibición (es decir, retardar en alguna medida, preferiblemente detener) de infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; 3) inhibición (es decir, retardar en alguna medida, preferiblemente detener) de metástasis tumoral; 4) inhibición, en alguna medida, de crecimiento tumoral; 5) alivio o reducción en alguna medida de uno o más síntomas asociados con el trastorno; y/o 6) alivio o reducción de efectos secundarios asociados con la administración de agentes anticancerígenos.

La frase "terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de un inhibidor de la proteinquinasa y un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 como parte de un régimen de tratamiento que tiene el propósito de proporcionar un efecto benéfico a partir de la co-acción de estos agentes terapéuticos. El efecto benéfico de combinación incluye, pero no está limitado a, co-acción farmacocinética o farmacodinámica que resulta a partir de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación típicamente es realizada durante un período de tiempo definido (usualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). La "terapia de combinación" generalmente no pretende incluir la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia que incidental y arbitrariamente resultan en las combinaciones del presente invento. La "terapia de combinación" pretende incluir la administración de estos agentes terapéuticos en una forma secuencial, es decir, en donde cada agente terapéutico es administrado en momentos diferentes, así como también la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, en una forma sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede realizar, por ejemplo, mediante la administración al sujeto de una cápsula única con una proporción fija del agente terapéutico o en múltiples cápsulas únicas para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico se puede realizar mediante cualquier ruta apropiada incluyendo, pero sin limitar a rutas orales, rutas intravenosas, rutas intramusculares, y la absorción directa a través de tejidos de membranas mucosas. Los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante la misma ruta o

mediante rutas diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada se puede administrar mediante inyección intravenosa mientras los otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar de forma oral.

Alternativamente, por ejemplo, ambos agentes terapéuticos se pueden administrar de

5 manera oral o ambos agentes terapéuticos se puede administrar mediante inyección intravenosa. La secuencia en la cual los agentes terapéuticos son administrados no es estrechamente crítica. "Terapia de combinación" también incluye la administración de los agentes terapéuticos tal como se describió anteriormente en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos (tales como, pero sin limitar a, un segundo y

10 diferente agente antineoplásico) y terapias no farmacológicas (tales como, pero sin limitar a, cirugía o tratamiento de radiación). Donde la terapia de combinación comprende además tratamiento de radiación, el tratamiento de radiación puede ser realizado en cualquier momento apropiado siempre y cuando se logre un efecto benéfico a partir de la co-acción de la combinación del agente terapéutico y el tratamiento de radiación. Por ejemplo, en

15 casos apropiados, el efecto benéfico es aún logrado cuando el tratamiento de radiación es temporalmente removido de la administración de los agentes terapéuticos, quizás por días o aún semanas.

La "terapia adjunta" incluye tratamiento del sujeto con agentes que reducen o evitan efectos secundarios asociados con la terapia de combinación del presente invento,

20 incluyendo, pero sin limitar, a aquellos agentes, por ejemplo, que reducen el efecto tóxico de fármacos anticancerígenos, ejemplo, inhibidores de resorción ósea, agentes cardioprotectores; previenen o reducen la incidencia de náuseas y vómito asociados con quimioterapia, radioterapia o cirugía; o reducen la incidencia de infección asociada con la administración de fármacos anticancerígenos mielosupresivos.

25

REALIZACIONES PREFERIDAS

Mientras la definición más amplia está establecida en el resumen de invento, ciertos compuestos de la fórmula (I), (II) y (III) divulgados a continuación son preferidos para

30 realizar el presente invento.

150

A. Inhibidor de la proteinquinasa tirosina – compuestos de la fórmula (I):

- 5 (1) Un grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^1 , R^3 , y R^4 son hidrógeno.
- (2) Otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^1 , R^3 , y R^4 son hidrógeno.
- (3) Otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^1 , R^2 , y R^3 son hidrógeno.
- 10 (4) Otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^2 , R^3 , y R^4 son hidrógeno.
- (5) Otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno.
- 15 (6) Aún otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^5 , R^6 o R^7 , preferiblemente R^5 o R^6 o, más preferiblemente R^6 es $-\text{COR}^{10}$ en donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ en donde:
 R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior, preferiblemente hidrógeno o metilo;
 N es 2, 3, o 4, preferiblemente 2 o 3; y
 R^{12} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ en donde R^{13} y R^{14} se combinan para formar un grupo
20 seleccionado de $-(\text{CH}_2)_4-$, $-(\text{CH}_2)_5-$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ o $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2-$,
preferiblemente R^{13} y R^{14} son independientemente un hidrógeno, metilo, etilo, o se
combinan para formar morfolin-4-ilo, pirrolidin-1-ilo, piperazin-1-ilo, o 4-
metilpiperazin-1-ilo.
Más preferiblemente, R^5 o R^6 en (6) anterior es N-(2- dietilaminoetil-
25)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-
30 metilpiperazin-1-il) etilaminocarbonilo, 2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)

151

etilaminocarbonilo o 2-(3,5-dimetilpiperzin-1-il)propilaminocarbonilo, aún más preferiblemente N-(2-dietil-aminoetil)aminocarbonilo o N-(2-etilaminoetil)amino-carbonilo.

(7) Aún otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^5 , R^6 o R^7 , preferiblemente R^5 o R^6 , más preferiblemente R^6 es $-COR^{10}$ en donde R^{10} es $-NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo, preferiblemente alquilo inferior sustituido con hidroxilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, o carboxilo, más preferiblemente metilo, etilo, propilo o butilo sustituido con hidroxilo, arilo, heteroalíclico tal como piperidina, piperazina, morfolina y similares, heteroarilo, o carboxilo. Aún más preferiblemente dentro de este grupo (7), R^5 o R^6 es 2-etoxilcarbonilmetil-aminocarbonilo, carboximetilamino-carbonilo, 3-hidroxipropil-aminocarbonilo, 2-hidroxietilaminocarbonilo, 3-triazin-1-ilpropilamino-carbonilo, triazin-1-iletilaminocarbonilo, 4-hidroxifeniletilaminocarbonilo, 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 la fórmula (I) es aquel en donde R^5 , R^6 o R^7 , preferiblemente R^5 o R^6 , más preferiblemente R^6 es $-COR^{10}$ en donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ en donde:

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

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

R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo, preferiblemente un heterociclo de 5,6 o 7 miembros que contiene un grupo carbonilo y uno o dos átomos de nitrógeno. Preferiblemente, R^5 o R^6 es 2-(3-etoxilcarbonilmetilpiperazin-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-etoxilcarbonilmetilpiperazin-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)propil-aminocarbonilo, 2-(2-oxohomopiperidin-1-il)etilamino-carbonilo o 3-(2-oxohomopiperidin-1-il) propilaminocarbonilo.

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

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

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

N es 2, 3 o 4, preferiblemente 2 o 3; y

R^{12} es $-\text{R}^{13}\text{R}^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es cianoalquilo o $-\text{NHCORa}$ donde Ra es alquilo; o

(b) R^{10} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ en donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo que no contiene un grupo carbonilo dentro del anillo.

Preferiblemente, R^5 o R^6 es 2-(2-ciano etilamino)etilaminocarbonilo, 2-

(acetilamino)-etilaminocarbonilo, morfolincarbonilo, piperidin-1-il-

carbonilo, 2-cianometilaminoetilaminocarbonilo o piperidino-1-ilcarbonilo.

- (10) Otro grupo preferido de compuestos la fórmula (I) es aquel en donde R^5 es $-\text{COR}^{10}$ en donde R^{10} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo

inferior sustituido con hidroxilo, alquilo inferior sustituido con

hidroxialquilamino, carboxilo, o $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ en donde R^{18} y R^{19} son

independientemente hidrógeno o alquilo inferior, más preferiblemente R^5 es 2-

[(dietilamino)-2-hidroxietil]aminocarbonilo, 2-(N-etil-N-2-

hidroxietilamino)etilaminocarbonilo, carboximetilamino-carbonilo, o 2-(2-

hidroxietilamino)etilamino-carbonilo.

- (11) Aún otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^6 es $-\text{COR}^{10}$ en donde R^{10} es $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo

inferior sustituido con hidroxilo, alquilo inferior sustituido con

hidroxialquilamino, carboxilo, o $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ en donde R^{18} y R^{19} son

independientemente hidrógeno o alquilo inferior; más preferiblemente R^6 es [2-

(dimetilamino)-2-hidroxietil]etilaminocarbonilo, 2-(N-etil-N-2-hidroxietil-

153

amino)etilaminocarbonilo, carboximetilaminocarbonilo, o 2-(2-hidroxi-etilamino)etilamino-carbonilo.

(12) Aún otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^5 es $-\text{COR}^{10}$ en donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ en donde R^{12} es $-\text{N}+(\text{O}-)\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ o $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$ en donde R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del un grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior, preferiblemente R^5 es 2-(N-hidroxi-N-etilamino)-etilaminocarbonilo, 2-[$\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$]etil-aminocarbonilo.

(13) Aún otro grupo preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde R^6 es $-\text{COR}^{10}$ en donde R^{10} es $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ en donde R^{12} es $-\text{N}+(\text{O}-)\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ o $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$ en donde R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior, preferiblemente R^6 es 2-(N-hidroxi-N-etilamino)etilaminocarbonilo o 2-[$\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$]etil-aminocarbonilo.

(14) en los grupos anteriores preferidos (6)-(13) cuando R^5 es $-\text{COR}^{10}$, entonces un grupo más preferido de compuestos es aquel en donde:

R^6 es seleccionados grupo que consta de hidrógeno y alquilo, preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, o n-butilo, más preferiblemente hidrógeno o metilo; y

R^7 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ en donde R^{17} es hidroxilo, alquilo o arilo, más preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, n- iso o tert-butilo, fenilo, benzoilo, acetilo o carboxilo, aún más preferiblemente metilo, hidrógeno o fenilo.

(15) En los grupos anteriores preferidos (6)-(13) cuando R^5 es $-\text{COR}^{10}$, entonces un grupo más preferido de compuestos es aquel en donde R^6 y R^7 se combinan para formar $-(\text{CH}_2)_4-$.

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

R^5 es seleccionado de grupo que consta de hidrógeno y alquilo, preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, o n-butilo, más preferiblemente hidrógeno o metilo; y

R^7 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-C(O)R^{17}$, en donde R^{17} es hidroxilo, alquilo o arilo, más preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, n-, iso o tert-butilo, fenilo, benzoilo, acetilo o carboxilo, aún más preferiblemente metilo, hidrógeno o fenilo.

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

R^1 es hidrógeno, alquilo, $-(O)NR^8R^9$, cicloalquilo o arilo, preferiblemente hidrógeno, fenilo, 3,4-dimetoxifenilaminocarbonilo, 4-metoxi-3-clorofenilaminocarbonilo, aún más preferiblemente hidrógeno o metilo, más preferiblemente hidrógeno;

R^2 es ciano, hidrógeno, halo, alcoxilo inferior, arilo o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo, preferiblemente R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, fluoro, metoxilo, etoxilo, fenilo, dimetilaminosulfonilo, 3-clorofenil-aminosulfonilo, carboxilo, metoxilo, aminosulfonilo, metilaminosulfonilo, fenilaminosulfonilo, piridin-3-il-aminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, isopropilamino-sulfonilo, más preferiblemente hidrógeno, fluoro, o bromo.

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alcoxilo inferior, $-(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo preferiblemente arilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, halo, o alcoxilo inferior, y heteroarilo, preferiblemente heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo un consta de alquilo inferior, halo, o alcoxilo inferior,; preferiblemente hidrógeno, metoxilo, carboxilo, fenilo, piridin-3-ilo, 3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-isopropilfenilo, 4-n-butilfenilo, 3-isopropilfenilo, más preferiblemente hidrógeno o fenilo; y

R^4 es hidrógeno

- (18) Otro grupo más preferido de compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde:

R^1 es hidrógeno, alquilo, $-C(O)NR^8R^9$, cicloalquilo o arilo, preferiblemente hidrógeno, 3,4-dimetoxi-fenil-aminocarbonilo, 4-metoxi-3-

155

diclorofenilaminocarbonilo, aún más preferiblemente hidrógeno o metilo, particularmente hidrógeno;

R^2 es ciano, hidrógeno, halo, alcoxilo inferior, arilo o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo, preferiblemente R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, fluoro, metoxilo, etoxilo, fenilo, dimetilaminosulfonilo, 3-diclorofenilo-aminosulfonilo, carboxilo, metoxilo, aminosulfonilo, metilaminosulfonilo, fenilaminosulfonilo, piridin-3-il-aminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, isopropilamino-sulfonilo, más preferiblemente hidrógeno, fluoro, o bromo;

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alcoxilo inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo preferiblemente arilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, halo, o alcoxilo inferior, y heteroarilo, preferiblemente heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, halo, o alcoxilo inferior; preferiblemente hidrógeno, metoxilo, carboxilo, fenilo, piridin-3-ilo, 3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-isopropilfenilo, 2-metoxi-5-isopropilfenilo, 4-n-butilfenilo, 3-isopropilfenilo, más preferiblemente hidrógeno o fenilo; y

R^4 es hidrógeno.

Dentro del grupo preferido anterior (18) un grupo preferido de compuestos es aquel en donde:

R^5 es $-COR^{10}$ donde R^{10} es tal se definió en el resumen del invento, preferiblemente $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ o $-NR^{13}R^{14}$ tal como se definió en el resumen del invento.

R^6 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo, preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, o n-butilo, más preferiblemente hidrógeno o metilo; y

R^7 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-C(O)R^{17}$ en donde R^{17} es hidroxilo, alquilo o arilo, más preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, n-, iso o tert-butilo, fenilo, benzoilo, acetilo o carboxilo, aún más preferiblemente metilo, hidrógeno o fenilo.

156

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

R^6 es $-\text{COR}^{10}$ en donde R^{10} es tal como se definió en el Resumen del Invento, preferiblemente $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ o $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ tal como se definió en el

R^5 es seleccionado grupo que consta de hidrógeno y alquilo, preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, o n-butilo, más preferiblemente hidrógeno o metilo; y

R^7 es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ en donde R^{17} es hidroxilo, alquilo o arilo, más preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, n-, iso o tert-butilo, fenilo, benzoilo, acetilo o carboxilo, aún más preferiblemente metilo, hidrógeno o fenilo.

(19) Otro grupo más preferido el compuestos de la fórmula (I) es aquel en donde:

R^1 y R^4 son hidrógeno;

R^2 es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, halo, alcoxilo inferior, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$ y $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$;

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alcoxilo inferior, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, arilo y heteroarilo;

R^5 es $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$;

R^6 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior; y

R^7 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior y $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$.

Esta es otra realización actualmente preferida de este invento que, en un compuesto con estructura tal como la descrita en (15):

R^{10} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, alcoxilo inferior y $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, en donde

n es 2 o 3;

R^{11} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior; y

R^{12} es seleccionado del grupo que consta de arilo y $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$.

157

Además esta es una realización actualmente preferida de este invento que, en un compuesto que tiene una estructura tal como la descrita en los dos párrafos anteriores, R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, y $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_5$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2$ - o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$ -.

(20) otra realización actualmente preferida de este invento es un compuesto en el cual:

R^1 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, $-(CH_2)_rR^{16}$ y $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, arilo, y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, alcoxilo inferior, arilo, heteroarilo y $-C(O)R^{15}$;

R^4 es hidrógeno;

R^5 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior;

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

R^7 es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior y arilo;

R^{16} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo y $-C(O)R^{15}$; y,

r es 2 o 3.

Una realización actualmente preferida de este invento es un compuesto que tiene como estructura aquella descrita en el párrafo anterior en la cual R^3 es arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior, alcoxilo inferior y halo.

(21) igualmente, esta es la realización actualmente preferida de este invento que, en un compuesto en el cual:

R^1 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, $-(CH_2)_rR^{16}$ y $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, arilo y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

158

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, alcoxilo inferior, arilo, heteroarilo y $-C(O)R^{15}$;

R^4 es hidrógeno;

R^5 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior;

5

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

R^7 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior y arilo;

R^{16} es seleccionado de grupo que consta de hidroxilo y $-C(O)R^{15}$; y,

r es 2 o 3,

10

R^{10} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, alcoxilo inferior, $-NR^{13}R^{14}$ y $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, en donde n es 1, 2 o 3, R^{11} es hidrógeno y R^{12} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, alcoxilo inferior, $-C(O)R^{15}$, heteroarilo y $-NR^{13}R^{14}$.

(22) una realización adicional actualmente preferida de este invento es un compuesto que tiene una estructura tal como la descrita del párrafo inmediatamente anterior en la cual R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, heteroarilo y, $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_5$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2$ - o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$ - combinados.

15

(23) Otra realización actualmente preferida de este invento es un compuesto en el cual:

20

R^1 es $-C(O)NR^8R^9$, en donde R^8 es hidrógeno y R^9 es arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados del grupo que consta de halo, hidroxilo y alcoxilo inferior;

R^2 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, arilo y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

25

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, alcoxilo inferior, arilo, heteroarilo y $-C(O)R^{15}$;

R^4 es hidrógeno;

R^5 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior;

30

MSA

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

R^7 es seleccionado de grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior y arilo;

R^{16} es seleccionado grupo que consta de hidroxilo y $-C(O)R^{15}$; y, r es

5

2 o 3,

(24) Una realización aún adicionalmente preferida de este invento es un compuesto en el cual:

R^1 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior;

10

R^2 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alcoxilo inferior, arilo, $-C(O)R^{15}$ y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, arilo, heteroarilo y $-C(O)R^{15}$;

R^4 es hidrógeno;

R^5 es $-C(O)R^{10}$; y,

15

R^6 y R^7 se combinan para formar un grupo $-(CH_2)_4$.

En un compuesto que tiene una estructura tal como la descrita en el párrafo inmediatamente anterior, es una realización actualmente preferida que R^{10} sea seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, alcoxilo, $-NR^{13}R^{14}$ y $-NH(CH_2)_nNR^{13}R^{14}$ en donde n es 2 o 3.

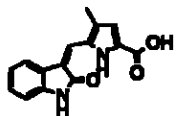
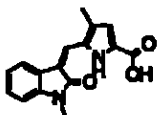
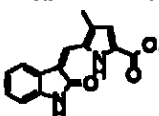
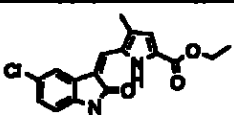
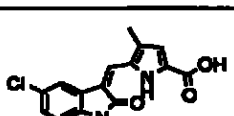
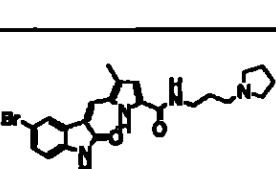
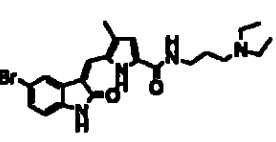
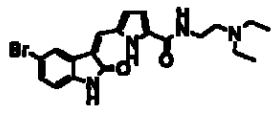
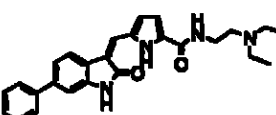
20

Es una realización actualmente preferida de este invento que, en un compuesto con una estructura tal como la descrita en los dos párrafos inmediatamente anteriores, R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo inferior, y, $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_5$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2$ - o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$ - combinados. Compuestos representativos de la fórmula (I) son mostrados en la Tabla I a continuación.

25

160

TABLE I

Example	Structure	Name
1		4-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid
2		4-Methyl-5-(1-methyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid
3		4-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid methyl ester
4		5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester
5		5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid
6		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
7		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
8		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
9		5-(2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

262

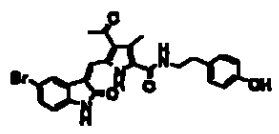
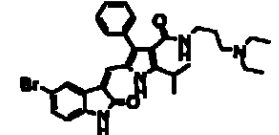
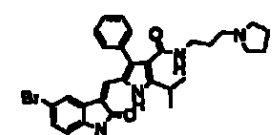
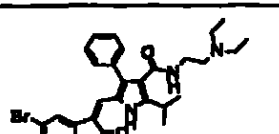
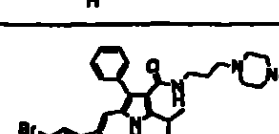
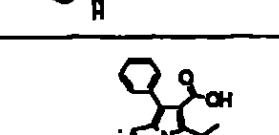
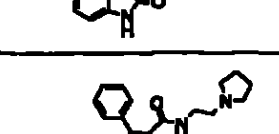
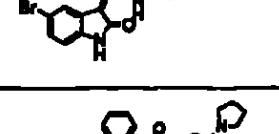
10		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)methylamide
11		5-(2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)methylamide
12		3-Methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
13		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
14		3-Methyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
15		5-(5-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
16		5-(6-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
17		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
18		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide

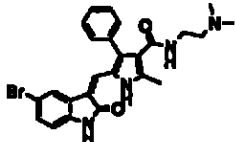
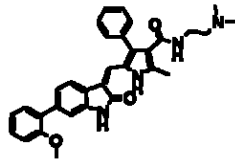
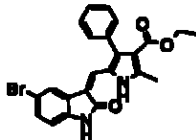
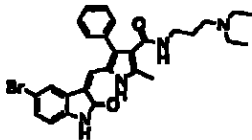
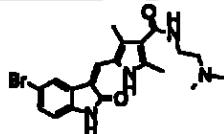
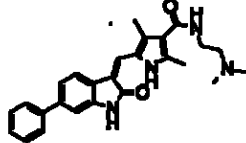
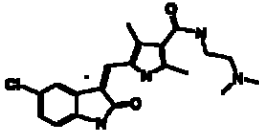
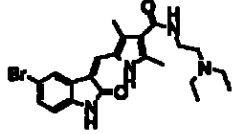
19		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
20		3-(2-Oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
21		4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
22		4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-morpholin-4-ylpropyl)amide
23		4-Benzoyl-3-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
24		4-Benzoyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
25		4-Benzoyl-3-methyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
28		4-Benzoyl-5-(6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide

263

27		4-Benzoyl-5-(5-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
28		4-Benzoyl-5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
29		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
30		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
31		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-morpholin-4-ylpropyl)amide
32		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3-hydroxy-propyl)amide
33		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-hydroxy-ethyl)amide
34		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-morpholin-4-yl-ethyl)amide
35		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

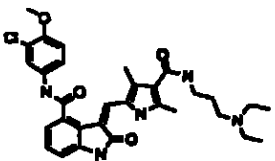
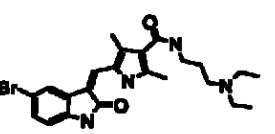
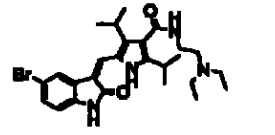
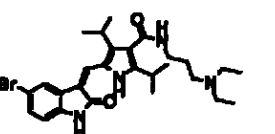
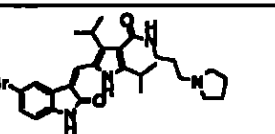
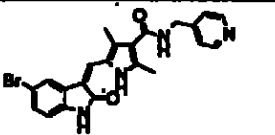
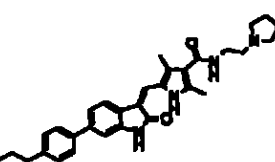
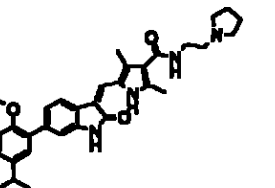
124

36		4-Acetyl-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (2-(4-hydroxy-phenyl)-ethyl)amide
37		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
38		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
39		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
40		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-(4-methyl-piperazin-1-yl)propyl)amide
41		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid
42		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
43		5-[8-(2-Methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

44		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
45		5-(8-(2-Methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
46		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester
47		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2-methyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
48		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
49		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
50		5-(5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
51		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide

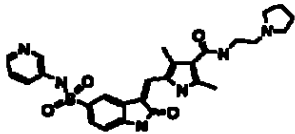
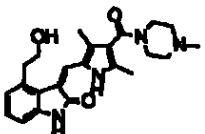
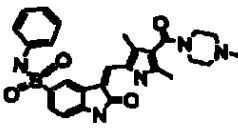
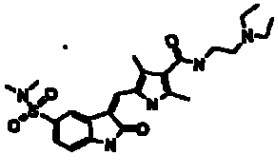
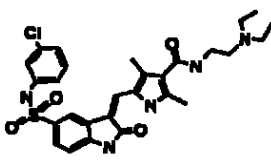
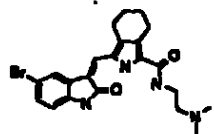
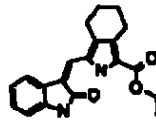
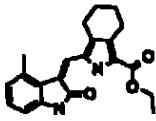
52		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
53		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide
54		5-[5-(2-Methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
55		5-[5-(3-Methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)amide
56		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
57		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
58		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide
59		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
60		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

61		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-imidazol-1-ylpropyl)amide
62		5-[8-(3,5-Dichloro-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
63		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
64		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
65		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-dimethylamino-propyl)amide
66		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-dimethylamino-propyl)amide
67		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
68		2,4-Dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide

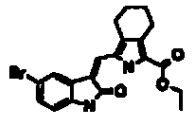
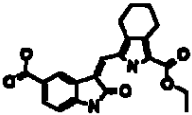
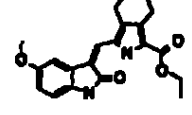
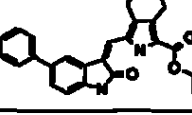
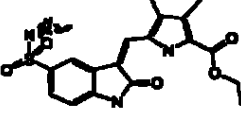
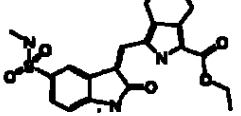
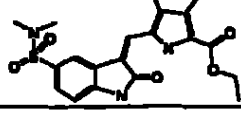
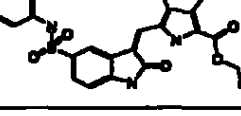
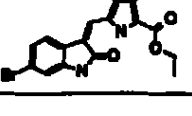
69		3-[4-(3-Diethylamino-propylcarbamoyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-4-carboxylic acid (3-chloro-4-methoxy-phenyl)amide
70		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
71		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
72		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-diethylaminopropyl)amide
73		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diisopropyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amide
74		5-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (pyridin-4-ylmethyl)amide
75		5-[8-(4-Butyl-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
76		5-[6-(5-Isopropyl-2-methoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

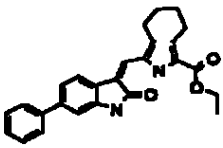
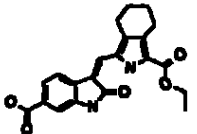
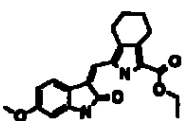
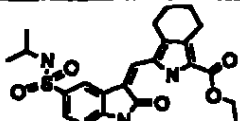
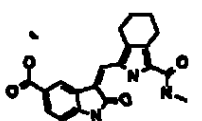
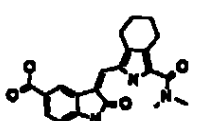
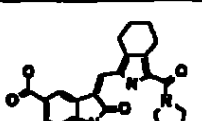
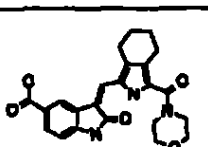
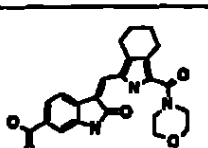
184

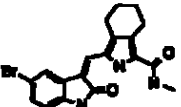
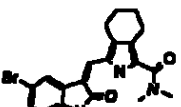
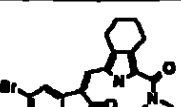
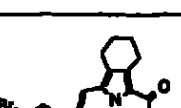
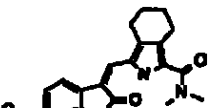
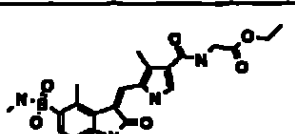
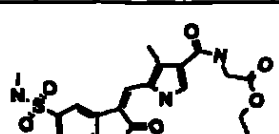
77		5-[6-(4-Ethyl-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
78		5-[6-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
79		5-[6-(3-Isopropyl-phenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
80		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
81		3-[4-(2-diethylaminoethylcarbamoyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid
82		5-[5-Dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
83		5-[5-(3-Chloro-phenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide

84		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-5-(pyridin-3-ylsulfamoyl)-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amide
85		3-[3,5-Dimethyl-4-(4-methyl-piperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-4-(2-hydroxy-ethyl)-1,3-dihydroindol-2-one
86		3-[3,5-Dimethyl-4-(4-methyl-piperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid phenylamide
87		5-[5-Dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
88		5-[5-(3-Chloro-phenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide
89		3-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl]-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid (2-dimethylamino-ethyl)-amide
90		3-[2-Oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl]-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid ethyl ester
91		3-[4-Methyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl]-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole-1-carboxylic acid ethyl ester

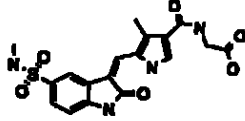
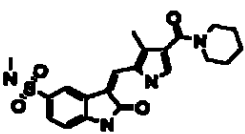
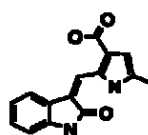
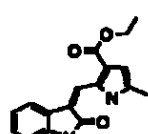
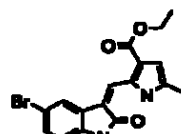
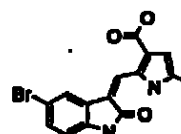
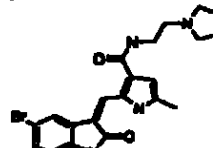
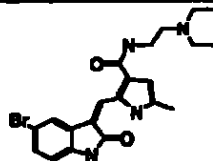
178

92		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
93		3-(3-Ethoxycarbonyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
94		3-(5-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
95		3-(2-Oxo-5-phenyl-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
96		3-(2-Oxo-5-sulfamoyl-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
97		3-(5-Methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
98		3-(5-Dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
99		3-(2-Oxo-5-phenylsulfamoyl-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester
100		3-(6-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid ethyl ester

101		3-(2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
102		3-(3-Ethoxycarbonyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
103		3-(6-Methoxy-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
104		3-(5-Isopropylsulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indole-1-carboxylic acid ethyl ester
105		3-(3-Methylcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
106		3-(3-Dimethylcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
107		2-Oxo-3-[3-(pyrrolidine-1-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indol-1-ylmethylene]-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
108		3-[3-(Morpholine-4-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indol-1-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-carboxylic acid
109		3-[3-(Morpholine-4-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indol-1-ylmethylene]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid

110		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid methylamide
111		3-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindole-1-carboxylic acid dimethylamide
112		5-Bromo-3-[3-(pyrrolidine-1-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene]-1,3-dihydro-indol-2-one
113		5-Bromo-3-[3-(morpholine-4-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene]-1,3-dihydro-indol-2-one
114		3-(3-Dimethylcarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isindol-1-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-6-carboxylic acid
115		4-Methyl-5-(5-methylsulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid
116		[(4-Methyl-5-(4-methyl-5-methylsulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino]-acetic acid ethyl ester
117		[(4-Methyl-5-(5-methylsulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino]-acetic acid ethyl ester

22

118		[4-Methyl-5-(5-methylsulfonyl-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carbonyl]-amino)-acetic acid
119		3-(3-Methyl-4-(piperidine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonic acid methylamide
120		5-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid
121		5-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester
122		2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester
123		2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid
124		2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide
125		2-(5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-5-methyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylamino-ethyl)-amide

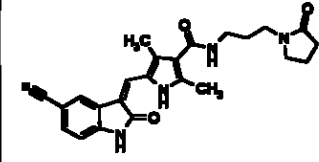
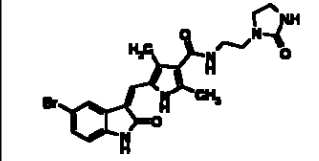
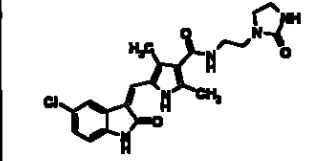
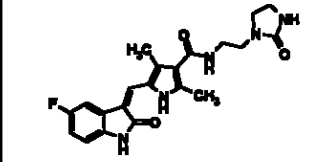
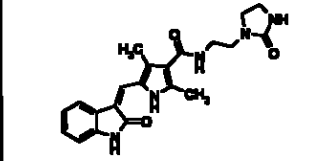
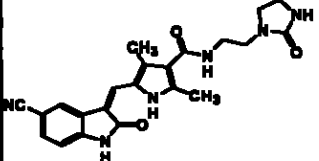
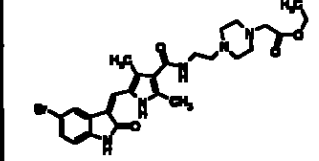
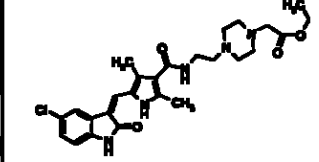
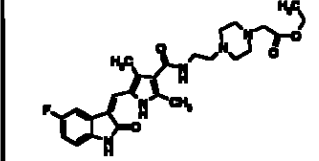
178

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	397 [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]	

176

133		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	399 [M-1]	
134		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	365 [M-1]	
136		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-tetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]-amide	447 [M+1]	
141		Trifluoro-acetate 4-[2-((5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium;	486 [M+1] 488 [M+1]	

177

142		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-oxo-imidazolidin-1-yl)-ethyl]-amide	392 [M-1]
147		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-piperazin-1-yl)-acetic acid ethyl ester	558 [M+1] 560 [M+1]
149		{4-[2-((5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-Indol-(3Z)-yildenemethyl]-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)-yildenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-piperazin-1-yl)-acetic acid ethyl ester	498 [M+1]

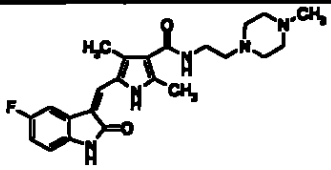
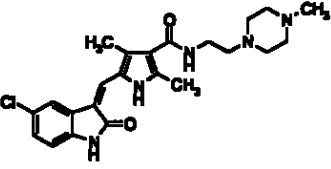
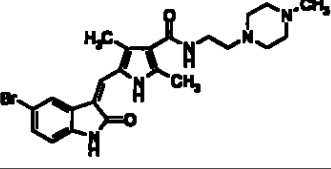
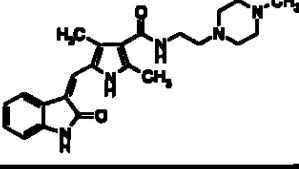
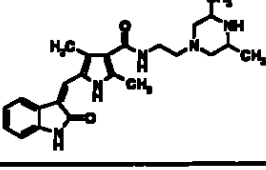
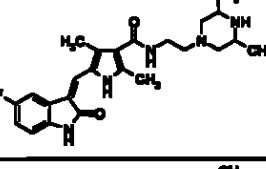
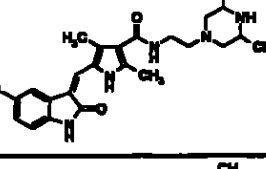
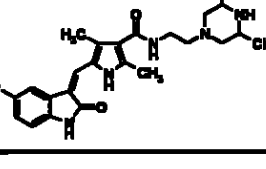
778

153		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(cyanomethyl-amino)-ethyl]-amide	382 [M-1]
154		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propyl]-amide	489 [M+1]
156		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propyl]-amide	480 [M+1]
159		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-acetylamino-ethyl)-amide	443 [M-1] 445 [M-1]

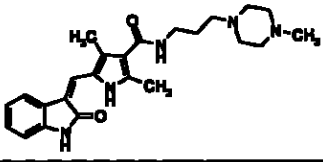
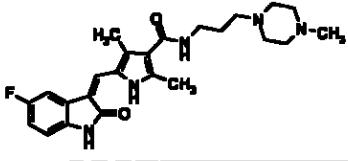
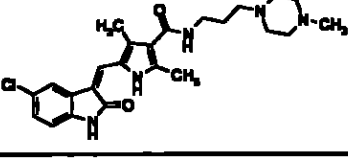
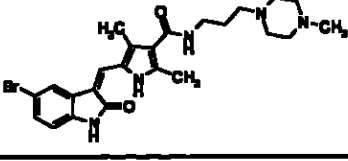
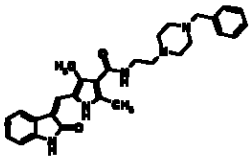
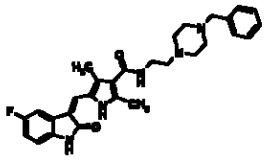
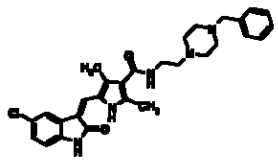
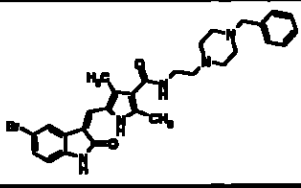
179

160		Trifluoro-acetate 4-[2-((5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium;	428 [M+1]
161		Trifluoro-acetate 4-[2-((2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-cyano-ethylamino)-ethyl]-amide	376 [M-1]
167		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl)-amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium;	440 [M-1]

150

168		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	406 [M-1]	
172		2,4-Dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	458 [M+1]	
175		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(3,5-dimethyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-amide	498 [M-1] 500 [M-1]	

168

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	488 [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	580 [M-1] 582 [M-1]	

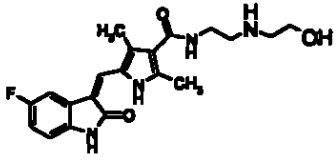
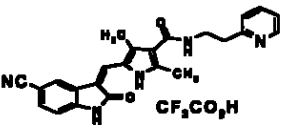
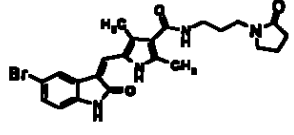
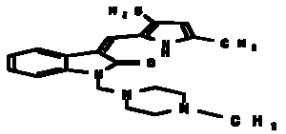
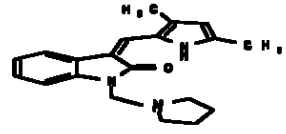
182

184		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carbonyl}amino)-ethyl]-2-oxo-piperazin-1-ium	440 [M-1]
186		5-[5-Chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1yl-2-one)-amide	
188		5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide	
190		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide trifluoroacetate salt	
191		5-[2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-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)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide trifluoroacetate salt	

183

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

184

202		5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid [2-(2-hydroxyethylamino)ethyl]-amide
203		5-[5-Cyano-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyridin-2-ylethyl)-amide trifluoroacetate
204		5-[5-Bromo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (3-pyrrolidin-1-yl-2-onepropyl)-amide trifluoroacetate
205		3-(3,5-dimethylpyrrol-2-ylmethylidene)-1-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-2-indollnone
206		3-(3,5-dimethylpyrrol-2-ylmethylidene)-1-(pyrrolidin-1-ylmethyl)-2-indollnone

Versión en español de la Tabla Anterior

Ejemplo	Nombre
1	Ácido 4-metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
2	Ácido 4-metil-5-(1-metil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
3	éster metílico del ácido 4-metil-5-(1-metil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
4	éster etílico del ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ildenemetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

165

5	Ácido 5(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
6	(3-pirrolidin-1-ilpropil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
7	(3-dietilaminopropil)amida del ácido 5(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
8	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
9	(2-dietilaminoetil) amida del ácido (2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
10	(2-dietilaminoetil)metilamida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
11	(2-dietilaminoetil) metilamida del ácido (2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
12	(3-dietilaminoprpi) amida del ácido 3-metil-5-(2-oxo1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
13	(3-dietilaminopropil) amida 5(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
14	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 3-metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)1H-pirrol-2-carboxílico
15	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 5-(5-metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
16	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 5-(6metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
17	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindole-1-carboxílico
18	(3-dietilaminonopropil) amida del ácido 3-(5-bromo-2-oxo1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)94,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-

186

	carboxílico
19	(3-pirrolidin -1-ilpropil) amida del ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
20	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 3-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
21	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-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-ilidenmetil)-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-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
24	(3-pirrolidin-1-ilpropil) amida del ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
25	(3-pirrolidin-1) amida del ácido 4-benzoil-3-metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-2-carboxílico
26	(3-pirrolidin-1-ilpropil) amida del ácido 4-benzoil-5-(6-metoxi-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-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-ilidenmetil)-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-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

187

29	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-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-ilidenmetil)-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-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
32	(3-hidroxi-propil) amida del ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
33	(2-hidroxi-etil) amida del ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
34	(2-morfolin-4-il-etil) amida del ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
35	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
36	[2-(4-hidroxi-fenil)etil] amida del ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
37	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-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-ilidenmetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

1986

39	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
40	[3-(4-metil-piperazin-1-il)propil] amida 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
41	Acido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
42	Acido (2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
43	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-[6-(2-metoxi-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
44	(2-dimetilamino-etil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
45	5-[6-(2-metoxi-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
46	Ester etílico del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
47	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-3-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
48	(2-dimetilamino-etil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
49	(2-dimetilamino-etil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
50	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-

1581

	dihidroindol-3-ilidenmetil)-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-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
53	(3-imidazol-1-ilpropil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
54	(2-dimetilamino-etil) amida del ácido 5-[6-(2-metoxi-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
55	(2-dimetilamino-etil) amida del ácido 5-[6-(3-metoxi-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
56	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
57	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
58	(3-imidazol-1-ilpropil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
59	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
60	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
61	(3-imidazol-1-ilpropil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
62	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 5-[6-(3,5-dicloro-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
63	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico

64	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
65	(3-dimetilamino-propil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
66	(3-dimetilamino-propil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
67	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
68	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico.
69	(3-cloro-4-metoxi-fenil) amida del ácido 3-[4-(3-dietilaminopropilcarbamoil)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetilene]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-4-carboxílico
70	(3-dietilaminopropil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
71	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico
72	(3-dietilaminopropil) amida 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico
73	(3-pirrolidin-1-ilpropil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico
74	(piridin-4-ilmetil) amida del ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
75	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-[6-(4-butil-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-

191

	carboxílico
76	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-[6-(5-isopropil-2-metoxi-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
77	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-[6-(4-etil-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
78	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-[6-(2,4-dimetoxi-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
79	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-[6-(3-isopropil-fenil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
80	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
81	Acido 3-[4-(2-dietilaminoetilcarbamoil)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico
82	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-(5-dimetilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
83	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 5-[5-(3-cloro-fenilsulfamoil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
84	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-5-(piridin-3-ilsulfamoil)-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
85	3-[3,5-dimetil-4-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-4-(2-hidroxi-etil-1,3-dihidroindol-2-ona

192

86	Fenilamida del ácido 3-[3,5-dimetil-piperazina-1-carbonil]-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico
87	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 5-(5-dimetilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
88	(2-dietilaminoetil) amida del ácido 5-[5-(3-cloro-fenilsulfamoil)-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
89	(2-dimetilamino-etil) amida del ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
90	Ester etílico del ácido 3-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
91	Ester etílico del ácido 3-(4-metil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
92	Ester etílico del ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
93	Ácido 3-(3-etoxicarbonil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
94	Ester etílico del ácido 3-(5-metoxi-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
95	Ester etílico del ácido 3-(2-oxo-5-fenil-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
96	Ester etílico del ácido 3-(2-oxo-5-sulfamoil-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
97	Ester etílico del ácido 3-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
98	Ester etílico del ácido 3-(5-dimetil-sulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-

	carboxílico.
99	Ester etílico del ácido 3-(2-oxo-5-fenilsulfamoil-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
100	Ester etílico del ácido 3-(6-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
101	Ester etílico del ácido 3-(2-oxo-6-fenil-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
102	Acido 3-(3-etoxicarbonil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico
103	Ester etílico del ácido 3-(6-metoxi-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
104	Ester etílico del ácido 3-(5-isopropilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
105	Acido 3-(3-metilcarbamoil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
106	Acido 2-oxo-3[3-pirrolidin-1-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
107	Acido 2-oxo-3[3-(pirrolidina-1-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
108	Acido 3-[3-(mofolina-4-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-carboxílico
109	Acido 3-[3-(morfolina-4-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico
110	Metilamida del ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
111	Dimetilamida del ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-carboxílico
112	5-bromo-3-[3-(pirrolidina-1-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-

194

	isoindol-1-ilmetileno]-1,3-dihidro-indol-2-ona
113	5-bromo-3-[3-(pirrolidina-4-carbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-1,3-dihidro-indol-2-ona
114	Acido 3-(3-dimetilcarbamoil-4,5,6,7-tetrahidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-6-carboxílico
115	Acido 4-metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
116	Ester etílico del ácido {[4-metil-5-(4-metil-5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}}-acético.
117	Ester etílico del ácido {[4-metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético
118	Acido {[4-metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}acético
119	Metilamida del ácido 3-[3-metil-4-(piperidina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico
120	Acido 5-metil-2-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
121	Ester etílico del ácido 5-metil-2-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
122	Ester etílico del ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-carboxílico
123	Acido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico
124	(2-pirrolidin-1-il-etil) amida del ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico
125	(2-dietilamino-etil) amida del ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

133	(2-acetilamino-etil) amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
134	(2-acetilamino-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
135	(2-acetilamino-etil)-amida 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
136	[3-(2-oxo-tetrahidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
137	[3-(2-oxo-tetrahidro-pirimidin-1-il)-propil] -amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
138	[3-(2-oxo-tetrahidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
139	[3-(2-oxo-tetrahidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
140	[3-(2-oxo-tetrahidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
141	Trifluoro-acetato 4-[2-({5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-ium;
126	(2-dietilaminoetil)-amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
127	(2-dietilaminoetil)-amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-

196

	indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
128	(2-pirrolidin-1-ilet)- amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
129	(2-pirrolidin-1-ilet)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
130	(2-pirrolidin-1-ilet)-amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
131	(2-dimetilaminoetil) -amida 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
132	(2-dimetilaminoetil)-5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
142	[3-(2-oxo-pirrolidin-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
143	[2-(2-oxo-imidazolidin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
144	[2-(2-oxo-imidazolidin-1-il) amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
145	[2-(2-oxo-imidazolidin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
146	[2-(2-oxo-imidazolidin-1-il)-etil]-amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
147	[2-(2-oxo-imidazolidin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-ciano-2-

197

	oxo-1,2-dihidro-indol- (3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
148	Ester etílico del ácido {4-[2-({5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
149	Ester etílico del ácido {4-[2-({5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino)-etil]-piperazin-1-il)-acético
150	Ester etílico del ácido {4-[2-({5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3- carbonil)-amino)etil]-piperazin-1-il)-acético
153	[2-(cianometil-amino)-etil]-amida del ácido 2,4- dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
154	[3-(2-oxo-azepan-2-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
155	[3-(2-oxo-azepan-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
156	[3-(2-oxo-azepan-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
157	[3-(2-oxo-azepan-1-il)-propil]-amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
158	[3-(2-oxo-azepan-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
159	(2-acetilamino-etil)-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

198

160	Trifluoro-acetato-4-[2-({5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-ium;
161	Trifluoro-acetato-4-[2-({2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-ium;
162	Trifluoro-acetato-4-[2-({5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-ium;
163	[2-(2-ciano-etilamino)-etilamino)-etil]-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
164	[2-(2-ciano-etilamino)-etil]amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
165	[2-(2-ciano-etilamino)-etil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
166	[2-(2-ciano-etilamino)-etil] amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
167	[2-(2-ciano-etilamino)-etil]-amida 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
168	Trifluoroacetato4 [2-({5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H_pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-ium;
168	[2-(4-metil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
169	[2-(4-metil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido5-[5-cloro-2-

	oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil+-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
170	[2-(4-metil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílica
171	[2-84-metil-piperazin-1-il)-etil]- amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
172	[2-(3-5-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
173	[2-(3,5-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida
174	[2-(3,5-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
175	[2-(3,5-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
176	[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
177	[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
178	[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2dihidro-indol-(3Z)-pirrol-3-carboxílico
179	[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]-amida del ácido 5-[5-bromo-

200

	2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
180	[2-(4-bencil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido
181	[2-(4-bencil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
182	[2-(4-bencilpiperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
183	[2-(4-bencil-piperazin-1-il)-etil]-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
184	(3-pirrolidin-1il-2-ona)-amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
185	4-[2-({5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-ium
186	(3-pirrolidin—1il-2-ona)-amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
187	(3-pirrolidin-1il-2-ona)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
188	(3-pirrolidin-1il-2-ona)-amida del ácido 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
189	(2-piridin-2-iletíl)-amida del ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
190	Sal de trifluoroacetato de (2-piridin-2-iletíl)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-

201

	1H-pirrol-3-carboxílico
191	Sal de hidrocloreto de (2-piridin-2-iletí)-amida del ácido 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
192	Sal de trifluoroacetato de (2-piridin-2-iletí)-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
193	(2-etilaminoetil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
194	(2-aminoetil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
195	(2-dietil-N-oxoaminoetil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
196	(2-etil-N-hidroxiaminoetil)-amida 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
197	(2-dietilamino-2-hidroxietil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
198	[2-etil-2-(2-hidroxietil)aminoetil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
199	[2-etil-2-(1-hidroxietil)aminoetil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
200	(2-N-acetilaminoetil)-amida del ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
201	(carboximetil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-

202

	indol (3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
202	[2-(2-hidroxietilamino)etil]-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol (3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
203	Trifluoroacetato (2-piridin-2-iletíl)-amida del ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
204	Trifluoroacetato (3-pirrolidin-1-il-2-onapropil)-amida del ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-1H-pirrol-3-carboxílico
205	3-(3,5-dimetilpirrol-2-ilmetilideno)-1-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-2-indolinona
206	3-(3,5-dimetilpirrol-2-ilmetilideno)-1-(pirrolidin-1-ilmetil)-2-indolinona

Los números de los compuestos corresponden a los números de los ejemplos en la Sección de Ejemplos. Es decir, la síntesis del Compuesto 1 en la Tabla 1 es descrita en el Ejemplo 1. Los compuestos presentados en la Tabla 1 son de ejemplo solamente y no pretenden ser considerados como limitantes del alcance de este invento en ninguna forma. Inhibidores adicionales de la proteinquinasa que se pueden utilizar en este método incluyen 3-(3,5-dimetilpirrol-2-ilmetilideno)-2-indolinona (su 5416); 3-[3,5-dimetil-4-(2-carboxietil)pirrol-2-ilmetilideno]-2-indolinona (su 6668), y 3-[3-(2-carboxietil)-5-metilpirrol-2-ilmetilideno]-2-indolinona.

B. Inhibidores Selectivos de la ciclooxigenasa-2 – Compuestos de la Fórmula (II) y (III):

Ejemplos no limitantes de inhibidores de la COX-2 que se pueden utilizar en el presente invento son identificados en las tablas II y III a continuación.

203

TABLA II

Compuesto	Nombre Comercial/de investigación	Referencia	Dosis
Pirazoles 1,5-Diphenyl-3-substituidos		WO 97/13755	
	Radiciol	WO 96/25928. Kwon et al (Cáncer Res(1992) 52 6296)	
	GB-02283745		
	TP-72	Cáncer Res 1998 58 4 717 -723	
1-(4-clorobenzil)-3-[4-(4-fluoro-fenil) tiazol-2-ilmetil]-5-metoxi-2-metilindol	A-183827.0		
	GR-253035		
4-(4-ciclohexil-2-metiloxazol-5-il)-2-fluorobencenosulfonamida	JTE-522	JP 9052882	
5-cloro-3-(4-(metilsulfonil)fenil)-2-(metil-5-piridinil)-piridina			
2-(3,5-difluoro-fenil)-3-4-(metilsulfonil)-fenil)-2-ciclopenten-1-ona			
	L-768277		
	L-783003		
	MK-966; VIOXX®	US 5968974	125-100 mg po
Ácido indolalcanoico indometacina-derivado		WO 96/374679	200 mg/kg/día
1-Metilsulfonil-4-[1,1-dimetil-4-(4-fluorofenil)ciclopenta-2,4-		WO 95/30656. WO 95/30652. WO 96/38418. WO 96/38442.	

204

Compuesto	Nombre Comercial/de investigación	Referencia	Dosis
dien-3-il]benceno			
4,4-dimetil-2-fenil-3-[4-(metilsulfonyl)fenil]ciclobutenona			
2-(4-metoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoylfenil)-pirrol		EP 799823	
N-[5-(4-fluoro)fenoxi]tiofeno-2-metanosulfon-amida	RWJ-63556		
5(E)-(3,5-di-tert-butyl-4-hidroxi)benzideno-2-etil-1,2-isotiazolidina-1,1-dioxido	S-2474	EP 595546	
3-formilamino-7-metilsulfonilamino-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-4-ona	T-614	DE 38/34204	
Bencenosulfonamida, 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)-	Celecoxib	US 5466823	
CS 502	(Sankyo)		
Ácido 2-[(2-cloro-6-fluorofenil)amino]-5-metilbencenoacético	Lumiracoxib (Cox-189)	WO 99/11605	
5-cloro-6'-metil-3-[4-(metilsulfonyl)fenil]-2,3'-bipiridina	Etoricoxib (MK 663)	WO 98/03484	
	BMS 34070	US 6180651	
	Meloxicam	US 4233299	15-30 mg/día

705

Compuesto	Nombre Comercial/de investigación	Referencia	Dosis
	Nimesulide	US 3840597	

206

TABLA III

WO 99/30721	WO 99/30729	US 5760068	WO 98/15528
WO 99/25695	WO 99/24404	WO 99/23087	FR 27/71005
EP 921119	FR 27/70131	WO 99/18960	WO 99/15505
WO 99/15503	WO 99/14205	WO 99/14195	WO 99/14194
WO 99/13799	GB 23/30833	US 5859036	WO 99/12930
WO 99/11605	WO 99/10332	WO 99/10331	WO 99/09988
US 5869524	WO 99/05104	US 5859257	WO 98/47890
WO 98/47871	US 5830911	US 5824699	WO 98/45294
WO 98/43966	WO 98/41511	WO 98/41864	WO 98/41516
WO 98/37235	EP 86/3134	JP 10/175861	US 5776967
WO 98/29382	WO 98/25896	ZA 97/04806	EP 84/6,689
WO 98/21195	GB 23/19772	WO 98/11080	WO 98/06715
WO 98/06708	WO 98/07425	WO 98/04527	WO 98/03484
FR 27/51966	WO 97/38986	WO 97/46524	WO 97/44027
WO 97/34882	US 5681842	WO 97/37984	US 5686460
WO 97/36863	WO 97/40012	WO 97/36497	WO 97/29776
WO 97/29775	WO 97/29774	WO 97/28121	WO 97/28120
WO 97/27181	WO 95/11883	WO 97/14691	WO 97/13755
WO 97/13755	CA 21/80624	WO 97/11701	WO 96/41645
WO 96/41626	WO 96/41625	WO 96/38418	WO 96/37467
WO 96/37469	WO 96/36623	WO 96/36617	WO 96/31509
WO 96/25405	WO 96/24584	WO 96/23786	WO 96/19469
WO 96/16934	WO 96/13483	WO 96/03385	US 5510368
WO 96/09304	WO 96/06840	WO 96/06840	WO 96/03387
WO 95/21817	GB 22/83745	WO 94/27980	WO 94/26731
WO 94/20480	WO 94/13635	FR 27/70,131	US 5859036
WO 99/01131	WO 99/01455	WO 99/01452	WO 99/01130

207

WO 98/57966	WO 98/53814	WO 98/53818	WO 98/53817
WO 98/47890	US 5830911	US 5776967	WO 98/22101
DE 19/753463	WO 98/21195	WO 98/16227	US 5733909
WO 98/05639	WO 97/44028	WO 97/44027	WO 97/40012
WO 97/38986	US 5677318	WO 97/34882	WO 97/16435
WO 97/03678	WO 97/03667	WO 96/36623	WO 96/31509
WO 96/25928	WO 96/06840	WO 96/21667	WO 96/19469
US 5510368	WO 96/09304	GB 22/83745	WO 96/03392
WO 94/25431	WO 94/20480	WO 94/13635	JP 09052882
GB 22/94879	WO 95/15316	WO 95/15315	WO 96/03388
WO 96/24585	US 5344991	WO 95/00501	US 5968974
US 5945539	US 5994381	US 6180651	

Los pirazoles se pueden preparar mediante los métodos descritos en WO 95/15316.

Los pirazoles además se pueden preparar mediante métodos descritos en WO 95/15315.

- 5 Los pirazoles también se pueden preparar mediante los métodos descritos en WO 96/03385.

Los análogos de tiofeno se pueden preparar mediante los métodos descritos en WO 95/00501. La preparación de análogos de tiofeno también es descrita en WO 94/15932. Los oxazoles se pueden preparar mediante los métodos descritos en WO 95/00501. La

preparación de oxazoles también es descrita en WO 94/27980. Los isoxazoles se pueden

- 10 preparar mediante los métodos descritos en WO 96/25405. Los imidazoles se pueden

preparar mediante los métodos descritos en WO 96/033387. Los inhibidores de la ciclopenteno ciclooxigenasa-2 se pueden preparar mediante los métodos descritos en la Patente U.S. No. 5.344.991. La preparación de inhibidores de la ciclopenteno cox-2

también se describe en WO 95/00501. Los compuestos de terfenilo se pueden preparar

- 15 mediante los métodos descritos en WO 96/16934. Los compuestos de tiazol se pueden

preparar mediante los métodos descritos en WO 96/03-392. Los compuestos de piridina se

206

pueden preparar mediante los métodos descritos en WO 96/03392. La preparación de compuestos de piridina también se describe en WO 96/24585.

El celecoxib utilizado en las combinaciones terapéuticas del presente invento también se puede preparar en la forma divulgada en la Patente U.S. No. 5.466.823.

5 En valdecoxib utilizado en combinaciones terapéuticas del presente invento puede ser preparado en la forma divulgada en la Patente U.S. No. 5.633.272.

El parecoxib utilizado en combinaciones terapéuticas del presente invento se puede preparar en la forma divulgada en la Patente U.S. No. 5.932.598.

10 El rofecoxib utilizado en las combinaciones terapéuticas del presente invento se puede preparar en la forma divulgada en la Patente U.S. No. 5.968.974.

El JTE-522 de Japan Tobacco utilizado en las combinaciones terapéuticas del presente invento se puede preparar en la forma divulgada en WO 99/11605.

El etoricoxib (MK 663) utilizado en las combinaciones terapéuticas del presente invento se puede preparar en la forma divulgada en WO 98/03484.

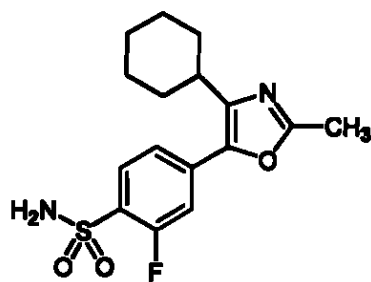
15 BMS 34070 de Bristol Meyers Squibb utilizado en las combinaciones terapéuticas del presente invento se puede preparar en la forma divulgada en la Patente U.S. No. 6.180.651.

20 Las anteriores referencias listadas en las tablas II y III anteriores describen varios inhibidores de la COX-2 apropiados para utilizar en el presente invento descrito en la presente, y procesos para su fabricación, son de ésta manera individualmente incorporados como referencia.

Los inhibidores de la COX-2 preferidos que se pueden utilizar en el presente invento incluyen, pero no están limitados a:

25 C1)

201



JTE-522, 4-(4-ciclohexil-2-metiloxazol-5-il)-2-fluorobencenosulfonamida;

5

C2)

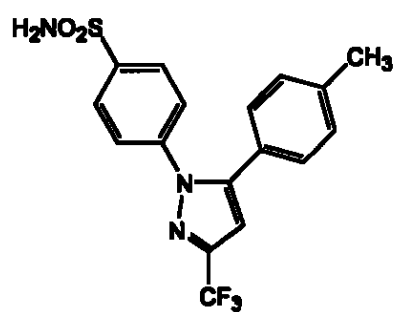
5-cloro-3-(4-(metilsulfonil)fenil)-2-(metil-5-piridin)piridina;

C3)

2-(3,5-difluorofenil)-3-4,(metilsulfonil)-2-ciclopenten-1-ona;

10

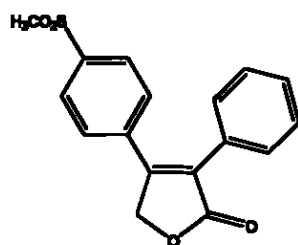
C4)



4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-bencenosulfonamida;

15

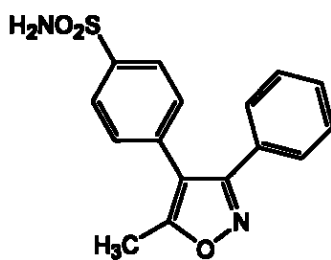
C5)



210

rofecoxib, 4-(4-(metilsulfonil)fenil]-3-fenil-2(5H)-furanona;

C6)

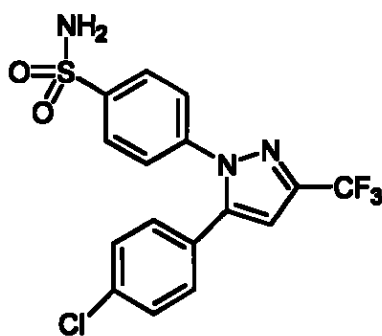


4-(5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)bencenosulfonamida;

C7)

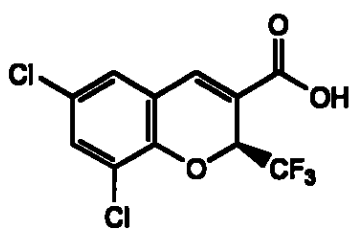
N-[[4-(5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)fenil]sulfonil]propanamida;

C8)



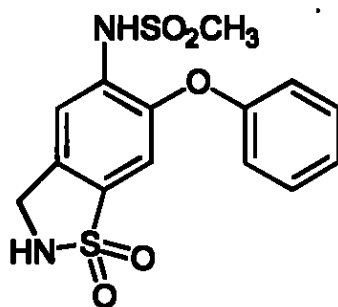
4-[5-(4-clorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida;

C9)



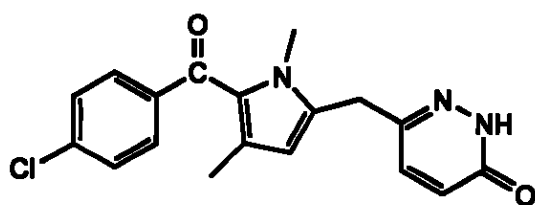
211

C10)



5

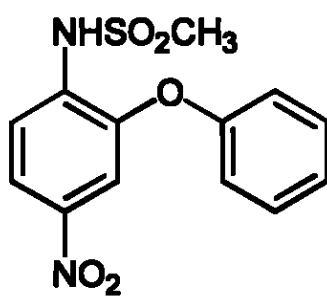
C11)



10

6-[[5-(4-clorobenzoil)-1,4-dimetil-1H-pirrol-2-il]metil]-3(2H)-piridazinona;

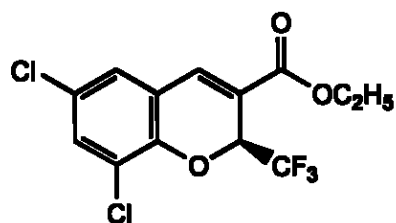
C12)



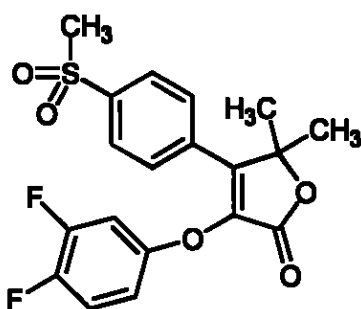
N-(4-nitro-2-fenoxifenil)metanosulfonamida;

15

C13)



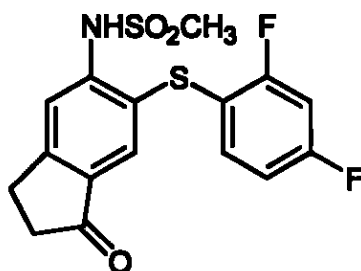
C14)



3-(3,4-difluorofenoxi)-5,5-dimetil-4-[4-(metoxisulfonyl)fenil]-2(5H)-

5 furanona;

C15)

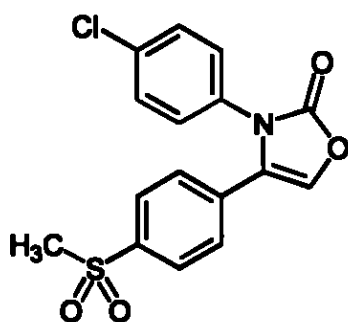


N-[6-[(2,4-difluorofenil)tio]-2,3-dihidro-1-oxo-1H-inden-5-

10 il]metanosulfonamida;

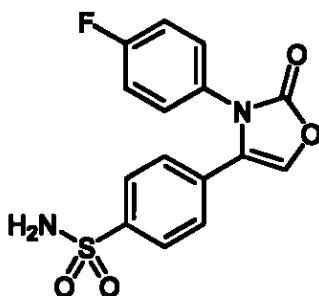
C16)

213



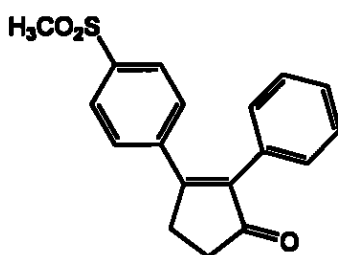
3-(4-clorofenil)-4-[4(metilsulfonil)fenil]-2(3H)-oxazolona;

C17)



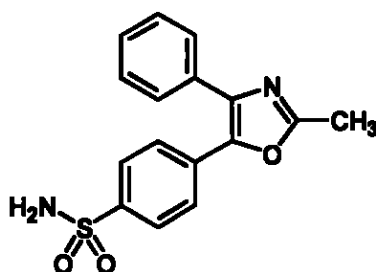
4[3-(4-fluorofenil)-2,3-dihidro-2-oxo-4-oxazolil]bencenosulfonamida;

C18)



3-[4-(metilsulfonil)fenil]-2-fenil-2-ciclopenten-1-ona,

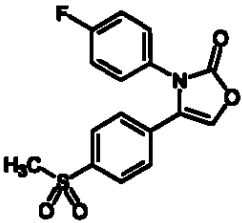
C19)



214

4-(2-metil-4-fenil-5-oxazolil)bencenosulfonamida;

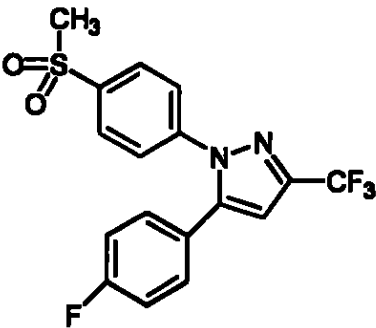
C20)



5

3-(4-fluorofenil)-4-[4-(metilsulfonil)fenil]-2(3H)oxazolona.

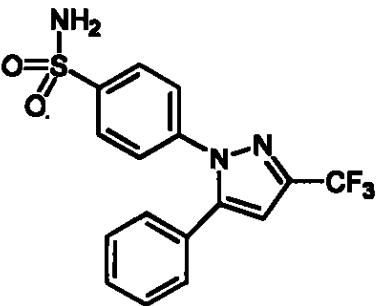
C21)



5-(4-fluorofenil)-1-[4-metilsulfonil)fenil]-3-(trifluorometil)-1H-pirazol;

10

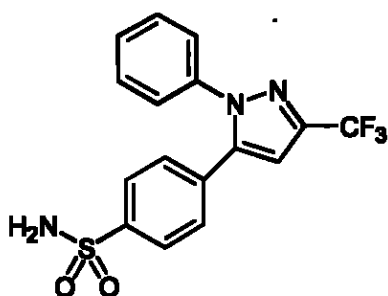
C22)



4-[5-fenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)bencenosulfonamida;

15

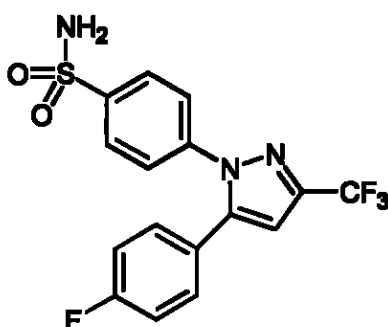
C23)



4-[1-fenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]bencenosulfonamida;

5

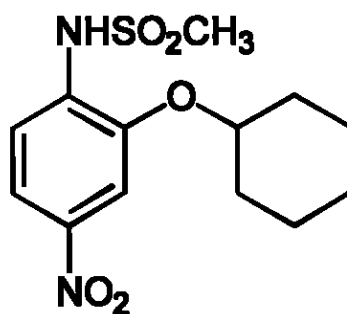
C24)



10

4-[5-(4-fluorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida;

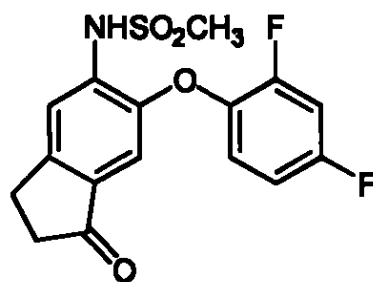
C25)



15

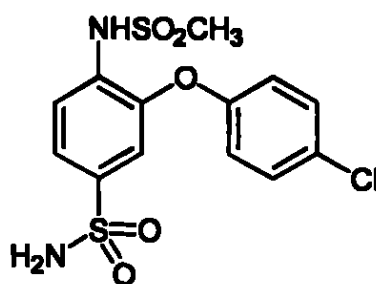
N-[2-(ciclohexiloxi)-4-nitrofenil]-metanosulfonamida;

C26)



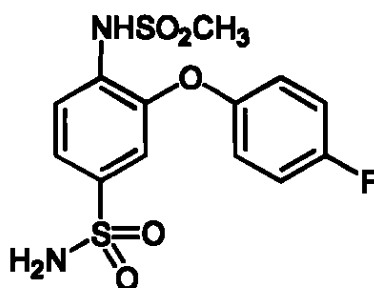
5 N-[6-(2,4-difluorofenoxi)-2,3-dihidro-1-oxo-1H-inden-5-il]metanosulfonamida;

C27)



10 3-(4-clorofenoxi)-4-[(metilsulfonil)amino]bencenosulfonamida;

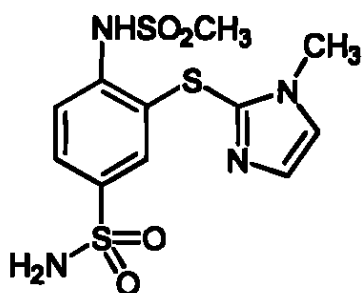
C28)



15 3-(4-fluorofenoxi)-4-[(metilsulfonil)amino]bencenosulfonamida;

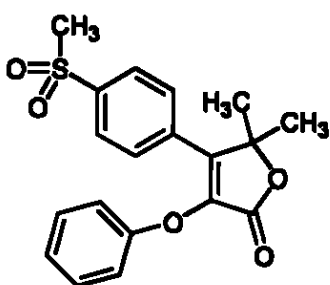
15

C29)



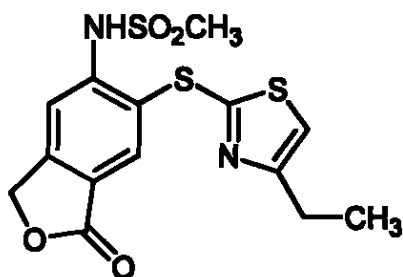
3-[(1-metil-1H-imidazol-2-il)tio]-
4[(metilsulfonil)amino]bencenosulfonamida;

5 C30)



5,5-dimetil-4-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-fenoxi-2(5H)-furanona;

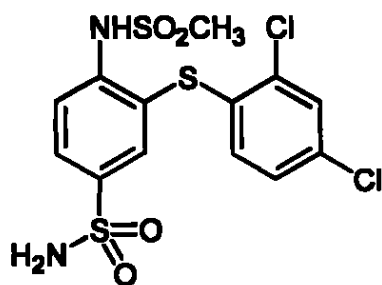
C31)



10

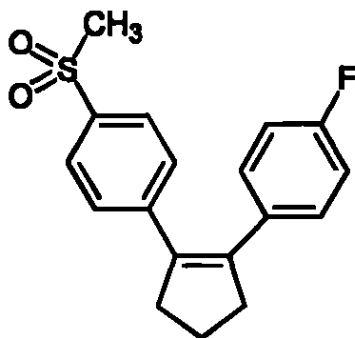
N-[6-[(4-etil-2-tiazolil)tio]-1,3-dihidro-1-oxo-5-
isobenzofuranil]metanosulfonamida;

C32)



3-[(2,4-diclorofenil)tio]-4-[(metilsulfonyl)amino]bencenosulfonamida;

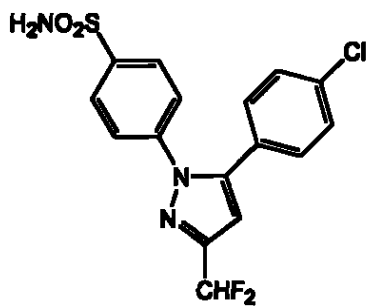
C33)



5

1-fluoro-4-[2-[4-(metilsulfonyl)fenil]ciclopenten-1-il]benceno;

C34)

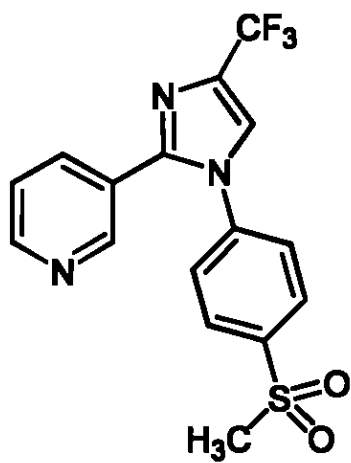


10

4-[5-(4-clorofenil)-3-(difluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida;

C35)

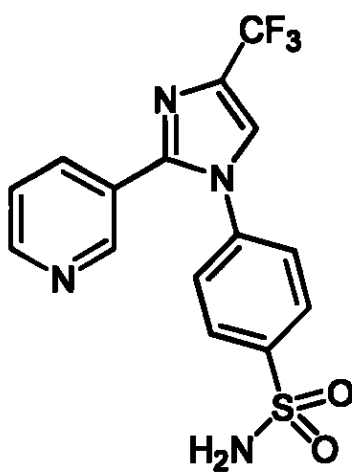
219



3-[1-[4-(metilsulfonyl)fenil]-4-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il]piridina;

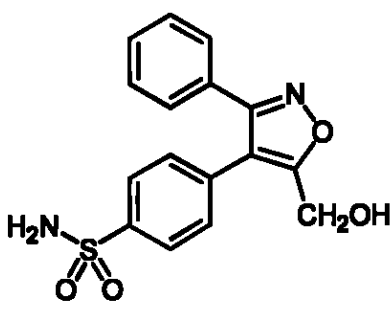
5

C36)



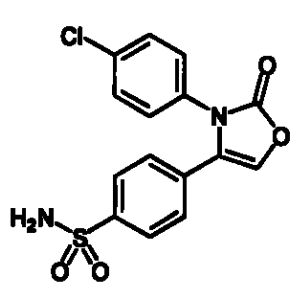
4-[2-(3-piridinil)-4-(trifluorometil)-1H-imidazol-1-il]bencenosulfonamida;

C37)



4-[5-(hidroximetil)-3-fenilisoxazol-4-il]bencenosulfonamida;

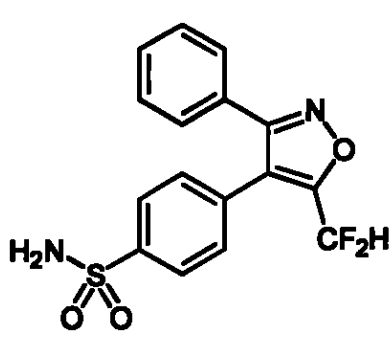
C38)



5

4-[3-(4-clorofenil)-2,3-dihidro-2-oxo-4-oxazolil]bencenosulfonamida;

C39)

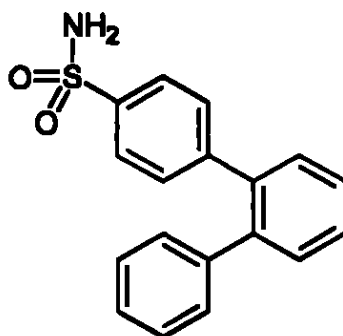


10

4[5(difluorometil)-3-fenilisoxazol-4-il]bencenosulfonamida;

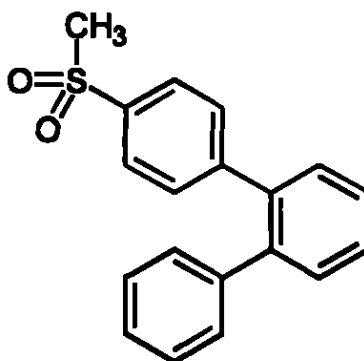
C40)

721



[1,1':2',1''-terfenil]-4-sulfonamida;

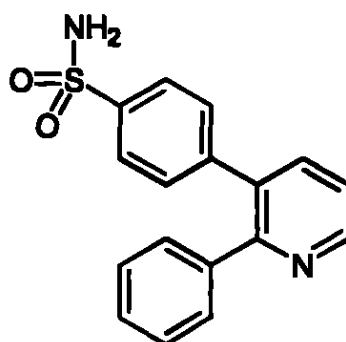
C41)



5

4-(metilsulfonil)-1-1',2], 1''-terfenilo;

C42)

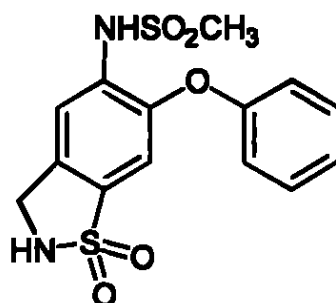


4-(2-fenil-3-piridinil)bencenosulfonamida;

10

C43)

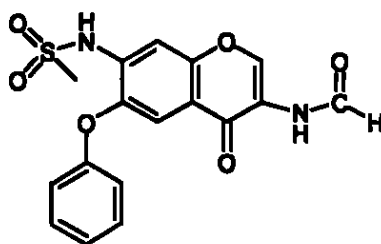
222



N-(2,3-dihidro-1,1-dioxido-6-fenoxi-1,2-benzisotiazol-5-il)metanosulfonamida; y

5

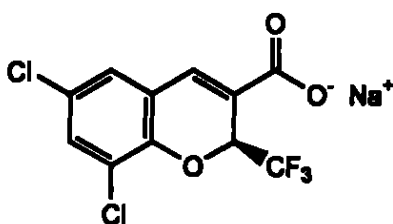
C44)



N-[3-(formilamino)-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-7-il]metanosulfonamida;

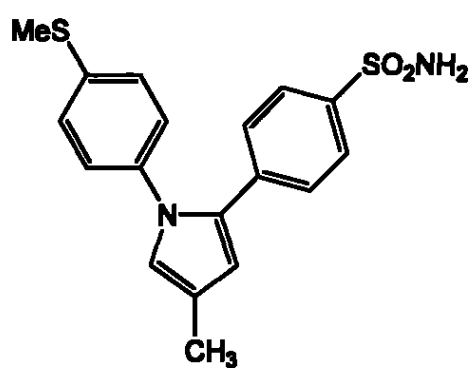
10

C45)

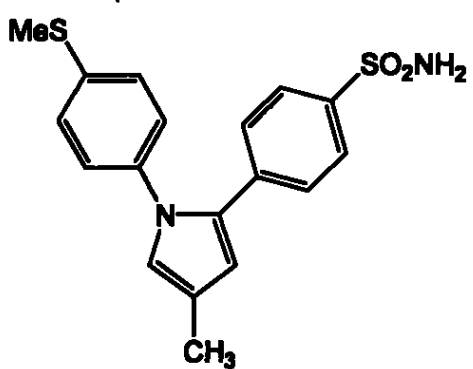


C46)

223

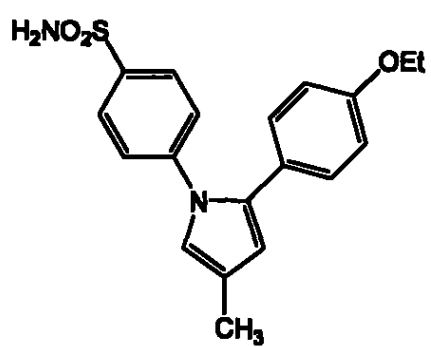


C47)



5

C48)

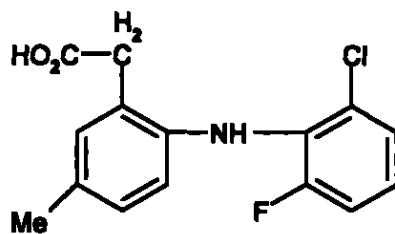


; y

10

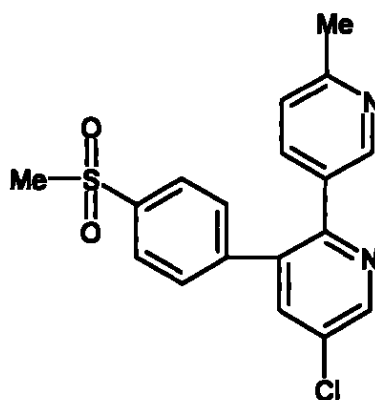
C49) lumirazoxib (COX-189)

224



ácido 2-[(2-cloro-6-fluorofenil)amino]-5-metilbencenoacético

C50) etoricoxib (MK 663)



5

5-cloro-6'-metil-3-[4-(metilsulfonil)fenil]-2,3'-bipiridina

C51) BMS 34070

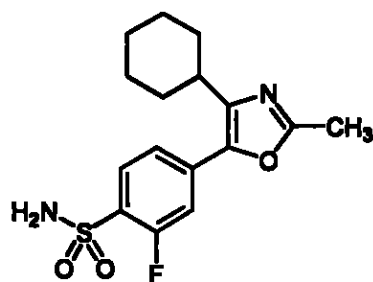


10

Inhibidores de la Cox-2 más preferidos que se pueden utilizar en el presente invento son seleccionados del grupo que consta de:

I)

25



JTE-522, 4-(4-ciclohexil-2-metiloxazol-5-il)-2-fluorobencenosulfonamida;

II)

5

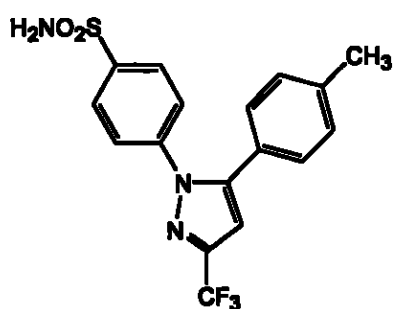
5-cloro-3-(metilsulfonil)fenil)-2-(metil-5-piridinil)piridina;

III)

2-(3,5-difluorofenil)-3-4-(metilsulfonil)fenil)-2-ciclopenten-1-ona;

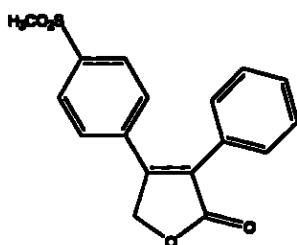
10

IV)



4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-bencenosulfonamida;

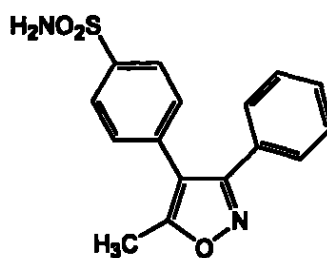
V)



15

Rofecoxib, 4-(4-(metilsulfonil)fenil)-3-fenil-2(5H)-furanona;

VI)



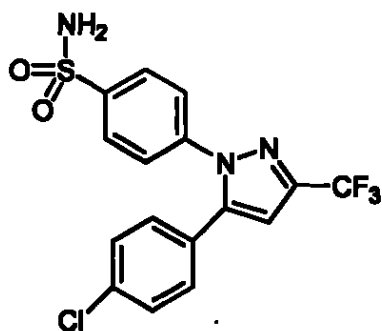
4-(5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)bencenosulfonamida;

5

VII)

N-[[4-(5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)fenil]sulfonil]propanamida;

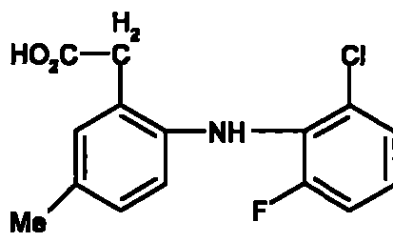
VIII)



10

4-[5-(4-clorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida; y

IX) lumiracoxib (COX-189)



15

ácido 2-[(2-cloro-6-fluorofenil)amino]-5-metilbencenoacético

Aún más preferiblemente, los inhibidores de la COX-2 que se pueden utilizar en el presente invento, incluyen pero no están limitados a celecoxib, valdecoxib, parecoxib, rofecoxib, lumiracoxib y JTE-522 de Japan Tobacco.

También incluidas en la combinación del invento están las formas isoméricas, profármacos y tautómeros de los compuestos descritos y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas son preparadas o partir de los ácidos fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucorínico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, mesílico, esteárico, salicílico, p-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embólico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, toluensulfónico, 2-hidroxi-etanosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, algénico, b- hidroxibutírico, galactárico y galacturónico.

Utilidad

Los compuestos del presente invento son inhibidores de las proteinquinasas (PKs) y la enzima ciclooxigenasa, en particular la enzima ciclooxigenasa-2, y por lo tanto son útiles en el tratamiento del cáncer.

Las PKs cuya actividad catalítica es modulada por los compuestos de la fórmula (I) de este invento incluyen proteinquinasas tirosina tales como tirosinquinasas receptoras (RTKs), tirosinquinasas celulares (CTKs), serina-treoninaquinasas (STKs). La transducción de señales mediada por la RTK es iniciada mediante interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando), seguido por dimerización de receptores, estimulación temporal de la actividad intrínseca de la proteinquinaasa tirosina y fosforilación. Los sitios de unión son creados de ésta manera para moléculas transductoras de señales intracelulares y llevan a la formación de complejos con un espectro de moléculas señalizadoras citoplásmicas que facilitan la respuesta celular apropiada (ejemplo, división celular, efectos metabólicos sobre microambiente extracelular, etc.). Ver, Schlessinger y Ullrich, 1992, Neuron 9:303-391.

Se ha mostrado que los sitios de fosforilación de tirosina sobre receptores de factor de crecimiento funcionan como sitios de unión de alta afinidad para dominios SH2

228

(homología src) de moléculas señalizadoras. Fantl 1992, Cell 72:767- 778, y Koch, 1991, Science 252:668- 678. Se han identificado varias proteínas de sustrato intracelular que se asocian con RTKs. Éstas se pueden dividir en dos grupos principales: (1) sustratos que tienen un dominio catalítico, y (2) sustratos que carecen de tal dominio pero que sirven como adaptadores y se asocian con moléculas catalíticamente activas. Songyan, 1993, Cell 72:767- 778. La especificidad de las interacciones entre receptores y dominios SH2 de sus sustratos es determinada por los residuos de aminoácidos que circundan inmediatamente el residuo de tirosina fosforilado. Las diferencias en las afinidades de unión entre los dominios SH2 y las secuencias de aminoácidos que circundan los residuos de fosfotirosina sobre receptores particulares son consistentes con las diferencias observadas en sus perfiles de fosforilación de sustratos. Songyang, 1993, Cell 72:767- 778. Estas observaciones indican que la función de cada RTK es determinada no solamente por su patrón de expresión y disponibilidad de ligandos sino también por la disposición de rutas de transducción de señales corriente abajo que son activadas por un receptor particular. Por lo tanto, la fosforilación proporciona un paso regulador importante el cual determina la selectividad de rutas de señalización reclutadas mediante receptores de factor de crecimiento específicos, así como también receptores de factor de diferenciación.

Las STKs, que son principalmente citosólicas, afectan la bioquímica interna de la célula, a menudo con una respuesta posterior a un evento PTK. Las STKs han sido implicadas en el proceso de señalización el cual inicia la síntesis de ADN y mitosis subsiguiente llevando a la proliferación celular.

Por lo tanto, la transducción de señales PK resulta en, entre otras respuestas, proliferación celular, diferenciación, crecimiento y metabolismo. La proliferación de células anormales puede resultar en una amplia gama de trastornos y enfermedades, incluyendo el desarrollo de neoplasias tales como carcinoma, sarcoma, glioblastoma, y hemangioma, trastornos tales como leucemia, soriasis, arterioesclerosis, artritis y retinopatía diabética y otros trastornos relacionados con la angiogénesis no controlada y/o vasculogénesis.

Un conocimiento preciso del mecanismo mediante el cual los compuestos de este invento inhiben las PKs no es requerido para practicar el presente invento. Sin embargo,

mientras no se está limitado por la presente a cualquier mecanismo particular o teoría, se cree que los compuestos de la fórmula (I) interactúan con los aminoácidos en la región catalítica de las PKs. Las PKs típicamente poseen una estructura bi-lobulada en donde el ATP parece unirse en la hendidura entre los dos lóbulos en una región donde los aminoácidos son conservados entre las PKs. Se cree que los inhibidores de las PKs se unen mediante interacciones no covalentes tales como enlaces de hidrógeno, fuerzas van der Waals e interacciones iónicas en la misma región general donde el ATP antes mencionado se une a las PKs. Más específicamente, se cree que el componente de 2-indolinona de los compuestos de la fórmula (I) se fija en el espacio general normalmente ocupado por el anillo de adenina de ATP. La especificidad de una molécula particular para una PK particular puede entonces surgir como el resultado de interacciones adicionales entre los diferentes sustituyentes sobre el núcleo de 2-indolinona y los dominios de aminoácidos específicos a las PKs particulares. Por lo tanto, los diferentes sustituyentes de indolinona pueden contribuir a la unión preferencial a las PKs particulares. La capacidad para seleccionar compuestos activos en diferentes sitios de unión de ATP (u otro nucleótido) vuelve a los compuestos de la fórmula (I) útiles para dirigir a cualquier proteína a tal sitio. Los compuestos de la fórmula (I) divulgados en la presente por lo tanto tienen utilidad en ensayos *in vitro* para tales proteínas así como también exhiben efectos terapéuticos *in vivo* a través de interacción con tales proteínas.

Adicionalmente, los compuestos de la fórmula (I) proporcionan un enfoque terapéutico para el tratamiento en muchas clases de tumores sólidos, incluyendo pero sin limitar a los carcinomas, sarcomas incluyendo sarcoma de Kaposi, eritroblastoma, glioblastoma, meningioma, astrocitoma, melanoma y mioblastoma. El tratamiento o prevención de cánceres de tumores no sólidos tales como la leucemia también son contemplados por este invento. Las indicaciones pueden incluir, pero no están limitadas a cánceres cerebrales, cánceres de vejiga, cánceres ováricos, cánceres gástricos, cánceres pancreáticos, cánceres de colon, cánceres sanguíneos, cánceres pulmonares y cánceres óseos.

Ejemplos adicionales, sin imitación, de los tipos de trastornos relacionados con actividad PK que los compuestos de presente invento pueden prevenir, tratar y estudiar, son trastornos proliferativos celulares, trastornos fibróticos y trastornos metabólicos.

Las trastornos proliferativos celulares, los cuales pueden ser prevenidos, tratados o estudiados adicionalmente mediante el presente invento incluyen cáncer, trastornos proliferativos de vasos sanguíneos y trastornos proliferativos de células mesangiales.

Los trastornos proliferativos de vasos sanguíneos se refieren a trastornos relacionados con vasculogénesis anormal (formación de vasos sanguíneos) y angiogénesis (diseminación de vasos sanguíneos). Mientras la vasculogénesis y angiogénesis juegan papeles importantes en una variedad de procesos fisiológicos normales tales como desarrollo embrionario, formación de cuerpo lúteo, cicatrización de heridas y regeneración de órganos, también juegan un papel crucial en el desarrollo del cáncer donde resultan en la formación de nuevas capilaridades necesarias para mantener un tumor vivo. Otros ejemplos de trastornos de proliferación de vasos sanguíneos incluyen artritis, donde nuevos vasos sanguíneos capilares invaden la articulación y destruyen el cartílago, trastornos oculares, como la retinopatía diabética, donde nuevas capilaridades en la retina invaden el vítreo, sangran y producen ceguera.

Se han identificado dos RTKs estructuralmente relacionadas por fijar VEGF con alta afinidad: el receptor de tirosina 1 tipo fms (fit-1) (Shibuya, 1990, Oncogeno, 5:519-524; De Vries, 1992, Science, 255:989- 991) y el receptor KDR/FLK- 1, también conocido como VEGF- R2. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ha sido reportado como un mitógeno específico celular endotelial con actividad promotora de crecimiento celular endotelial in vitro. Ferrara & Henzel, 1989, Biochein. Biophys. Res. Comm., 161:851- 858; Vaisman, 1990, J. Biol. Chem., 265:19461- 19566. La información divulgada en la solicitud U.S. No. Serial 08/193.829, 08/038.596 y 07/975.750, fuertemente sugiere que VEGF no es únicamente responsable de la proliferación celular endotelial, sino también es el regulador principal de la angiogénesis normal y patológica. Ver generalmente, Klagsburn & Soker, 1993, Current Biology, 3(10)699- 702; Houck, 1992, J. Biol. Chem., 267:26031- 26037.

La vasculogénesis y angiogénesis normales juegan papeles importantes 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 de folículos en el cuerpo lúteo durante la ovulación y crecimiento placentario después del embarazo. Folkman & Shing, 1992, J. Biological Chem., 267(16): 10931- 34. La vasculogénesis y/o angiogénesis no controladas han sido asociadas con trastornos tales como la diabetes así como también con tumores sólidos malignos que dependen de la vascularización para su crecimiento. Klagsburn & Soker, 1993, Current Biology, 3(10): 699- 702; Folkman, 1991, J. Natl. Cancer Inst., 82:4- 6; Weidner, 1991, New Engl. J. Med., 324:1- 5.

El supuesto papel de VEGF en la proliferación celular endotelial y migración durante angiogénesis y vasculogénesis indica un papel importante para el receptor KDR/FLK- 1 en estos procesos. Enfermedades tales como la diabetes mellitus (Folkman, 198, en XI Congreso de Trombosis y Hemostasis (Verstraeta), pp. 583- 596, Leuven University Press, Leuven) y artritis, así como también crecimiento tumoral maligno pueden surgir a partir de una angiogénesis no controlada. Ver ej., Folkman, 1971, N. Engl. J. Med., 285:1182- 1186. Los receptores a los cuales VEGF específicamente se fija son un blanco terapéutico importante y poderoso para la regulación y modulación de la vasculogénesis y/o angiogénesis y una variedad de enfermedades severas las cuales involucran crecimiento celular anormal producido por tales procesos. Plowman, 1994, DN&P, 7(6):334- 339. Más particularmente, el papel altamente específico del receptor KDR/FLK- 1 en la neovascularización hacen de éste un blanco de elección para enfoques terapéuticos al tratamiento del cáncer y otras enfermedades que involucran formación incontrolada de vasos sanguíneos.

Por lo tanto, el presente invento proporciona compuestos capaces de regular y/o modular la transducción de señales de la tirosinquinasa incluyendo transducción de señales de receptores KDR/FLK- 1 con el objeto de inhibir o promover la angiogénesis y/o vasculogénesis, es decir, compuestos que inhiben, previenen, o interfieren con la señal transducida por KDR/FLK- 1 cuando son activados por ligandos tales como VEGF.

Aunque se cree que los compuestos del presente invento actúan sobre un receptor u otro

componente a lo largo de la ruta de transducción de señales de las tirosinquinazas, también pueden actuar directamente sobre las células tumorales que resultan a partir de angiogénesis incontrolada.

Aunque las nomenclaturas de las contrapartes humanas y murinas del receptor "flk-
 5 I" genérico difieren, estas son en muchos aspectos intercambiables. El receptor murino, Flk- 1, y su contraparte humana, KDR, comparten una homología de secuencia del 93.4% dentro del dominio intracelular. Igualmente, el FLK- I murino fija VEGF humano con la misma afinidad que VEGT de ratón, y por consiguiente, es activado por el ligando derivado de una u otra especie. Millauer, 1993, Cell, 72:835- 846; Quinn, 1993, Proc. Natl. Acad.
 10 Sci. USA, 90:7533- 7537. La FLK- 1 también se asocia con y subsecuentemente tirosina fosforila sustratos RTK humanos (ej., PLC- y o p85) al co-expresarse en 293 células (fibroblastos de riñón embrionario humano).

Los modelos que dependen del receptor FLK- 1 por lo tanto son directamente aplicables para entender el receptor KDR. Por ejemplo, el uso del receptor FLK- 1 murino
 15 en métodos que identifican los compuestos que regulan la ruta de transducción de señales murinas son directamente aplicables a la identificación de compuestos que pueden ser utilizados para regular la ruta de transducción de señales humanas, es decir, los cuales regulan la actividad relacionada con el receptor KDR. Por lo tanto, los compuestos químicos identificados como inhibidores de KDR/FLK- 1 *in vitro*, pueden ser confirmados
 20 en modelos apropiados *in vivo*. Tanto los modelos animales de ratón como de rata *in vivo* han sido demostrados como de excelente valor para el examen del potencial clínico de agentes que actúan sobre la ruta de transducción de señales inducidas por KDR/FLK.

Por lo tanto, el presente invento proporciona compuestos que regulan, modulan y/o inhiben la vasculogénesis y/o angiogénesis al afectar la actividad enzimática del receptor
 25 KDR/FLK- 1 e interferir con la señal transducida por KDR/FLK- 1. Por lo tanto el presente invento proporciona un enfoque terapéutico para el tratamiento de muchas clases de tumores sólidos incluyendo, pero sin limitar a el glioblastoma, melanoma y sarcoma de Kaposi, y carcinoma ovárico, pulmonar, mamario, prostático, pancreático, de colon y epidermoide. Además, los datos indican que la administración de compuestos que inhiben

la ruta de transducción de señales mediada por KDR/Flk- 1 también se puede utilizar en el tratamiento de hemangioma, restenosis y retinopatía diabética.

Además, este invento se relaciona con la inhibición de la vasculogénesis y angiogénesis mediante otras rutas mediadas por receptores, incluyendo la ruta que comprende el receptor de flt- 1.

La transducción de señales mediada por la tirosinquinasa receptora es iniciada mediante la interacción extracelular de un factor de crecimiento específico (ligando), seguido por la dimerización de receptores, estimulación temporal de la actividad intrínseca de la proteinquinasa tirosina y autofosforilación. Los sitios de unión son de esta manera creados mediante moléculas de transducción de señales intracelulares lo cual lleva a la formación de complejos con un espectro de moléculas señalizadoras citoplásmicas que facilita la respuesta celular apropiada, ej., división celular y efectos metabólicos al microambiente extracelular. Ver, Schlessinger y Ullrich, 1992, Neuron, 9: 1- 20.

La homología próxima de las regiones intracelulares de KDR/FLK- 1 con aquella del receptor PDGF- β (homología de 50.3%) y/o el receptor flt- 1 relacionado indica la inducción de las rutas de transducción de señales superpuestas. Por ejemplo, para el receptor PDGF- β , los miembros de la familia src (Twamley, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7696- 7700), fosfatidilinositol- 3'- quinasa (Hu, 1992, Mol. Cell. Biol., 12:981- 990), fosfolipasa γ (Kashishian & Cooper, 1993, Mol. Cell. Biol., 4:49- 51), proteína activadora de la ras- GTPasa, (Kashishian, 1992, EMBO J., 11:1373- 1382), PTP- ID/syp (Kazlauskas, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10 90:6939- 6943), Grb2 (Arvidson, 1994, Mol. Cell. Biol., 14:6715- 6726) y las moléculas adaptadoras Shc y Nck (Nishumira, 1993, Mol. Cell. Biol., 13:6889- 6896) han sido demostrados por fijarse a regiones que involucran diferentes sitios de autofosforilación. Ver generalmente, Claesson- Welsh, 1994, Prog- Growth Factor Res., 5:37- 54. Por lo tanto, es probable que las rutas de transducción de señales activadas por KDR/FLK- 1 incluyan la ruta ras (Rozakis, 1992, Nature, 360:689- 692), la PI- 3'- quinasa, las rutas mediadas por src y mediadas por plcy. Cada una de estas rutas puede jugar un papel crítico en el efecto angiogénico y/o vasculogénico de KDR/FLK- 1 en células endoteliales. Consecuentemente, un aspecto adicional de este invento se relaciona con el uso de compuestos orgánicos descritos en la presente los cuales

modulan la angiogénesis y vasculogénesis puesto que tales procesos son controlados por estas rutas.

A la inversa, los trastornos relacionados con el encogimiento, contracción o cierre de vasos sanguíneos, tales como restenosis, también son implicados y se pueden tratar o
5 prevenir mediante los métodos de este invento.

Los trastornos fibróticos se refieren a la formación anormal de matrices extracelulares. Los ejemplos de trastornos fibróticos incluyen cirrosis hepática y trastornos proliferativos de células mesangiales. La cirrosis hepática se caracteriza por el aumento en constituyentes de matrices celulares que resultan en la formación de una cicatriz hepática.
10 Una matriz extracelular aumentada que resulta en una cicatriz hepática también puede ser producida mediante una infección viral tal como la hepatitis. Los lipocitos parecen jugar un papel crucial en la cirrosis hepática. Otros trastornos fibróticos implicados incluyen la aterosclerosis.

Los trastornos proliferativos de células mesangiales se refieren a trastornos
15 producidos por la proliferación anormal de células mesangiales. Los trastornos proliferativos mesangiales incluyen varias enfermedades renales humanas tales como la glomerulonefritis, retinopatía diabética y nefroesclerosis maligna así como también trastornos tales como síndromes de microangiopatía trombótica, rechazo de trasplantes, glomerulopatías. El RTK PDGFR ha sido implicado en el mantenimiento de la
20 proliferación celular mesangial. Floege, 1993, Kidney International 43:47S- 54S.

Muchos cánceres son trastornos proliferativos celulares y, como se anotó anteriormente, las PKs han sido asociadas con trastornos proliferativos celulares. Por lo tanto, no es sorprendente que las PKs tales como, por ejemplo, los miembros de la familia RTK hayan sido asociados con el desarrollo de cáncer. Algunos de estos receptores, como
25 EGFR (Tuzi, 1991, Br. J. Cáncer 63:227- 233, Torp, 1992, APMIS 100:713- 719) HER2/neu (Salmón, 1989, Science 244:707- 712) y PDGF- R (Kumabe, 1992, Oncogen 7:627- 633) son sobre- expresados en muchos tumores y/o persistentemente activados por ciclos autocrinos. En realidad, en los cánceres más comunes y severos, éstas sobre- expresiones receptoras (Akbasak y Suner- Akbasak, 1992, J. Neurol. Sci., 111:119- 133,
30 Dickson, 1992, Cáncer Treatment Res. 61:249- 273, Korc, 1992, J. Clin. Invest. 90:1352-

1360) y ciclos autocrinos (Lee y Donoghue, 1992, J. Cell. Biol., 118:1057- 1070, Korc, supra, Akbasak y Suner- Akbasak, supra) han sido demostradas. Por ejemplo, EGFR se ha asociado con el carcinoma escamocelular, astrocitoma, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar y cáncer de vejiga. HER2 se ha asociado con cáncer de mama, ovárico, gástrico, pulmonar, pancreático y de vejiga. PDGFR se ha asociado con glioblastoma y melanoma así como también un cáncer pulmonar, ovárico y prostático. RTK c- met también se ha asociado con formación de tumores malignos. Por ejemplo, c- met se ha asociado con, entre otros cánceres, carcinomas y linfomas colorectales, tiroideos, pancreáticos, gástricos y hepatocelulares. Adicionalmente c-met se ha vinculado con la leucemia. La sobre-expresión del gen c- met también se ha detectado en pacientes con enfermedad de Hodgkins y enfermedad de Burkitts.

IGF-IR además de estar implicado en el soporte nutricional y en diabetes tipo II, también se ha asociado con varios tipos de cánceres. Por ejemplo, IGF- I ha sido implicado como un estimulador de crecimiento autocrino para varios tipos de tumores, ej., células de carcinoma de cáncer de mama humano (Arteaga, 1989, J. Clin. Invest. 84:1418- 1423) y células de tumores pulmonares pequeños (Macauley, 1990, Cáncer Res., 50:2511- 2517). Además, IGF- I, aunque está integralmente involucrado en el crecimiento normal y diferenciación del sistema nervioso, también parece ser un estimulador autocrino de gliomas humanos. Sandberg- Nordqvist, 1993, Cáncer Res. 53:2475- 2478. La importancia de IGF- IR y sus ligandos en proliferación celular es adicionalmente soportada por el hecho que muchos tipos de células en cultivo (fibroblastos, células epiteliales, células de músculo liso, linfocitos-T y células mieloides, condrocitos y osteoblastos (las células troncales de la médula espinal)) son estimuladas a crecer por IGF- I. Goldring y Goldring, 1991, Eukaryotic Gene Expresión, 1:301- 326. Baserga y Coppola indican que IGF- IR juega un papel central en el mecanismo de transformación y, como tal, podría ser un blanco preferido para intervenciones terapéuticas de un amplio espectro de afecciones humanas. Baserga, 1995, Cáncer Res., 55:249- 252, Baserga, 1994, Cell 79:927- 930, Coppola, 1994, Mol. Cell. Biol., 14:4588- 4595.

Las STKs han sido implicadas en muchos tipos de cáncer incluyendo, notablemente cáncer de mama (Cance, Int. J. Cáncer, 54:571- 77 (1993)).

236

La asociación entre una actividad PK anormal y la enfermedad no está limitada al cáncer. Por ejemplo, las RTKs se han asociado con enfermedades tales como psoriasis, diabetes mellitus, endometriosis, angiogénesis, desarrollo de placa ateromatosa, enfermedad de Alzheimer, restenosis, enfermedad de von Hippel- Lindau, hiperproliferación epidermal, enfermedades neurodegenerativas, degeneración macular relacionada con la edad y hemangiomas. Por ejemplo, EGRF ha sido indicado en cicatrización de heridas corneanas y dérmicas. Los defectos en Insulina- R y IGF- 1R son indicados en diabetes mellitus tipo- II. Una correlación más completa entre RTKs específicas y sus indicaciones terapéuticas es divulgada en Plowman, 1994, DN&P 7:334-339.

Como se anotó previamente, no solamente las RTKs sino también las CTKs incluyendo, pero sin limitar a, src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr e yrk (reseñadas por Bolen, 1992, FASEB J., 6:3403- 3409) están involucradas en la ruta de traducción de señales proliferativas y metabólicas y así se podría esperar, y se ha mostrado, están involucradas en muchos trastornos mediados por PTK a los cuales el presente invento está dirigido. Por ejemplo, src mutado (v- src) ha sido mostrado como una oncoproteína (pp60^{v-src}) en pollos. Además, su homólogo celular, el proto-oncogén pp60^{c-src} transmite señales oncogénicas de muchos receptores. La sobre- expresión de EGFR o HER2/neu en tumores lleva a la activación constitutiva de pp60^{c-src}, lo cual es característica de células malignas pero ausente en células normales. Por otra parte, los ratones deficientes en la expresión de c- src exhiben un fenotipo osteopetrótico, indicando una participación clave de c- src en función de osteoclastos y un posible involucramiento en trastornos relacionados.

De manera similar, Zap70 ha sido implicada en señalización de células- T las cuales se pueden relacionar con trastornos autoinmunes.

Las STKs se han asociado con inflamación, enfermedad autoinmune, inmunorespuestas, y trastornos de hiperproliferación tales como restenosis, fibrosis, psoriasis, osteoartritis y artritis reumatoide.

Las PKs también se han implicado en la implantación de embriones. Por lo tanto, los compuestos de este invento pueden proporcionar un método efectivo para prevenir tal implantación de embriones y de esta manera ser útiles como agentes de control de

237

natalidad. Trastornos adicionales los cuales se pueden tratar o prevenir utilizando los compuestos de este invento son trastornos inmunológicos tales como enfermedad autoinmune, SIDA y trastornos cardiovasculares tales como aterosclerosis.

Finalmente, actualmente se sospecha que tanto las RTKs como las CTKs están involucradas en trastornos hiperinmunes.

Ejemplos del efecto del número de compuestos de ejemplo de este invento sobre varias PTKs son mostrados en la Tabla 2 a continuación. Los compuestos y datos presentados no se deben considerar como limitantes del alcance de este invento en ninguna forma.

B. El inhibidor de la ciclooxigenasa- 2 o inhibidor de la COX- 2 o inhibidor de la ciclooxigenasa- 2 incluye agentes que específicamente inhiben una clase de enzimas, la ciclooxigenasa- 2, con menor inhibición significativa de la ciclooxigenasa- 1.

Preferiblemente, incluyendo compuestos que tienen un IC_{50} de ciclooxigenasa- 2 menor que aproximadamente 0.2 μM , y también tienen una proporción de selectividad de inhibición de ciclooxigenasa- 2 sobre la inhibición de ciclooxigenasa- 1 de al menos 50, y más preferiblemente, de al menos 100. Aún más preferiblemente, los compuestos tienen un IC_{50} de ciclooxigenasa- 1 mayor que aproximadamente 1 μM , y más preferiblemente, mayor que 10 μM .

Los estudios indican que las prostaglandinas sintetizadas por ciclooxigenasas juegan un papel crítico en la iniciación y promoción del cáncer. Además, la COX- 2 es sobre expresada en lesiones neoplásicas del colon, mama, pulmón, próstata, esófago, páncreas, intestino, cervix, ovarios, vejiga urinaria, y cabeza y cuello. En varios modelos in vitro y animales, los inhibidores de la COX- 2 tienen crecimiento tumoral inhibido y metástasis.

Además de los cánceres *per se*, la COX- 2 también es expresada en la vasculatura angiogénica dentro y adyacente a las lesiones hiperplásicas y neoplásicas indicando que la COX- 2 juega un papel en angiogénesis. Tanto en el ratón como en la rata, los inhibidores de la COX- 2 marcadamente inhibieron la neovascularización inducida por bFGF. La utilidad de los inhibidores de la COX- 2 como agentes quimiopreventivos, antiangiogénicos y quimioterapéuticos es descrita en la literatura (koki. Opin. Invest. Fármacos (1999) 8(10)

pp. 1623- 1638, incorporada en la presente como referencia). Amplificación y/o sobreexpresión de HER- 2/neu (ErbB2) ocurre en 20- 30% de cánceres de mama y ováricos humanos así como también en 5- 15% de cánceres gástricos y esofágicos y está asociada con prognosis pobre. Adicionalmente, se ha descubierto recientemente in vitro que la expresión de la COX- 2 es aumentada en células que sobreexpresan el oncogén HER- 2/neu. (Subbaramaiah., expresión aumentada de ciclooxigenasa- 2 en cáncer de mama por sobreexpresión de HER- 2/neu. Investigación del Cáncer (presentada en 1999), incorporada en la presente como referencia). En este estudio, niveles marcadamente aumentados de producción de PGE₂, proteína COX- 2 y mRNA fueron detectados en células epiteliales mamarias HER- 2/neu transformadas en comparación con una línea celular de patrón no transformada. Los productos de la actividad de la COX- 2, es decir, las prostaglandinas, estimulan la proliferación, aumentan la invasividad de células malignas, y aumentan la producción de factor de crecimiento endotelial vascular, el cual promueve la angiogénesis. Además, HER- 2/neu induce la producción de factores angiogénicos tal como el factor de crecimiento endotelial vascular.

Consecuentemente, la administración de un inhibidor de la Cox- 2 en combinación con un anticuerpo de HER- 2/neu tal como trastuzumab (Herceptin®) y otras terapias dirigidas a inhibir HER- 2/neu es contemplada para tratar cánceres en los cuales HER- 2/neu es sobreexpresado.

También, se contempla que los niveles de la Cox- 2 son elevados en tumores con amplificación y/o sobreexpresión de otros oncogenes incluyendo pero sin limitar a *c- myc*, *N- myc*, *L- myc*, *K- ras*, *H- ras*, *N- ras*. Los productos de la actividad de la COX- 2 estimulan la proliferación celular, inhiben la vigilancia inmune, aumentan la invasividad de células malignas, y promueven la angiogénesis. Consecuentemente, la administración de un inhibidor de proteinquinasas en combinación con un inhibidor de la Cox- 2 del presente invento es útil para prevenir o tratar cánceres en los cuales los oncogenes son sobreexpresados.

Los inhibidores de la Cox- 2 específicos son útiles para el tratamiento de cáncer (WO98/16227) y en varios modelos animales reducen la angiogénesis promovida por varios factores de crecimiento (WO98/22101). La anti- angiogénesis fue lograda con un

23A

inhibidor de la Cox- 2 en ratas implantadas con bFGF, factor de crecimiento de endotelial vascular (VEGF) o carragenina, proteínas con propiedades angiogénicas bien conocidas (Masferrer, 89th Congreso Anual de la Asociación Americana para Investigación del Cáncer, Marzo 1998.)

5

Composición y Administración Farmacéutica

Un compuesto del presente invento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede administrar a un paciente humano o se puede administrar en
10 composiciones farmacéuticas en las cuales los anteriores materiales son mezclados con vehículos o excipientes apropiados. Las técnicas para formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Ciencias Farmacológicas de Remington," Mack Publising co., Easton, PA., última edición.

Como se utiliza en la presente, "administrar" o "administración" se refiere a la
15 liberación de un compuesto de la Fórmula (I) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica que contiene un compuesto la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de este invento a un organismo para el fin de prevención o tratamiento de un trastorno relacionado con PK.

Rutas de administración apropiadas pueden incluir, sin limitación, administración
20 oral, rectal, tópica, transmucosa o intestinal o inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intravítreas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares. Las rutas preferidas de administración son las oral y parenteral.

Alternativamente, se puede administrar el compuesto en una forma local más que
25 sistémica, por ejemplo, vía inyección del compuesto directamente en el tumor sólido, a menudo en una formulación depot o formulación de liberación sostenida.

Además, el fármaco se puede administrar en un sistema de entrega farmacológica dirigida, por ejemplo, en un liposoma recubierto con anticuerpo específico al tumor. Los liposomas serían dirigidos hacia y captados selectivamente por el tumor.

240

Las composiciones farmacéuticas del presente invento pueden ser fabricadas mediante procesos bien conocidos en el estado de la técnica, ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, lixiviación, emulsificación, encapsulación, o liofilización.

5 Las composiciones farmacéuticas, para utilizar según el presente invento, se pueden formular de manera convencional, utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables, que comprenden excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida.

10 Para inyección, los compuestos del invento se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o amortiguador de solución salina fisiológica. Para administración transmucosa, se utilizan en la formulación, penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada. Tales penetrantes generalmente son conocidos en el estado de la
15 técnica.

Para administración oral, los compuestos se pueden formular mediante la combinación de compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en el estado de la técnica. Tales vehículos permiten a los compuestos del invento ser formulados como tabletas, píldoras, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes,
20 lechadas, suspensiones y similares, para ingestión oral por el paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden hacer utilizando un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar otros aditivos apropiados si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes útiles son, en particular, rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa,
25 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, tragacanto, celulosa de metilo, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinil- pirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido
30 algínico. También se puede utilizar una sal tal como alginato de sodio.

241

Los núcleos de grageas son proporcionados con recubrimientos apropiados. Para este propósito, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentradas las cuales pueden opcionalmente contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, glicol de polietileno, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar oralmente incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como también cápsulas selladas suaves hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos mezclados con un relleno tal como lactosa, un aglomerante tal como almidón, y/o un lubricante tal como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente estabilizantes. En cápsulas suaves, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos apropiados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o glicoles de polietileno líquidos. También se pueden agregar estabilizadores en estas formulaciones.

Las cápsulas se pueden empacar en botellas plásticas o de vidrio de color café para proteger el compuesto activo de la luz. Los recipientes que contienen la formulación de cápsulas de compuesto activo se deben almacenar a temperatura ambiente controlada (15-30°C).

Para administración mediante inhalación, los compuestos para utilizar según el presente invento son convenientemente liberados en la forma de una atomización de aerosol utilizando un paquete presurizado o un nebulizador y un propulsor apropiado, ej., sin limitación, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetra-fluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede controlar proporcionando una válvula para liberar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para utilizar en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos también se pueden formular para administración parenteral, ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un preservativo agregado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener materiales de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de una forma soluble en agua, tal como, sin limitación, una sal, del compuesto activo. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar en un vehículo lipofílico. Vehículos lipofílicos apropiados incluyen aceites grasos tal como aceites de ajonjolí, ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de metilo y triglicéridos, o materiales tales como liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextran. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores y/o agentes apropiados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo apropiado, ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de utilizar.

Los compuestos se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, ejemplo, bases supositorias convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular como preparaciones depot. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implante (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Un compuesto de este invento se puede formular para esta administración con materiales poliméricos o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, en una emulsión con un aceite farmacológicamente aceptable), con resinas de intercambio iónico, o como un derivado apenas soluble tal como, sin limitación, una sal apenas soluble.

243

Un ejemplo no limitante de un vehículo farmacéutico para los compuestos hidrofóbicos del invento es un sistema cosolvente que comprende alcohol bencílico, un surfactante no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa tal como el sistema co- solvente VPD. VPD es una solución de alcohol bencílico al 3% peso/volumen, 8% peso/volumen del surfactante no polar Polisorbato 80, y glicol de polietileno 300 65% peso/volumen, llevado a volumen final con etanol absoluto. El sistema co- solvente VPD (VPD:D5W) consta de VPD diluido 1:1 con una dextrosa al 5% en solución de agua. Este sistema co- solvente disuelve compuestos hidrofóbicos, y por sí mismo produce baja toxicidad al realizar administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de tal sistema co- solvente pueden variar considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes co- solventes se puede variar: por ejemplo, otros surfactantes no polares de baja toxicidad se pueden utilizar en cambio del Polisorbato 80, el tamaño de fracción del glicol de polietileno se puede variar, otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar el glicol de polietileno, ej., polivinilpirrolidona, y otros azúcares o polisacáridos se pueden sustituir por dextrosa.

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de liberación para compuestos farmacológicos hidrofóbicos. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de liberación para fármacos hidrofóbicos. Además, también se pueden emplear ciertos solventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque con mayor toxicidad.

Adicionalmente, los compuestos se pueden liberar utilizando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el agente terapéutico. Varios materiales de liberación sostenida han sido establecidos y son bien conocidos por aquellos con experiencia en el estado la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante varias semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas en la presente también pueden comprender vehículos o excipientes apropiados en fase gel o sólida. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no están limitados a, carbonato de calcio, fosfato de calcio,

244

varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como glicoles de polietileno.

Muchos de los compuestos moduladores de PK del invento se pueden proporcionar como sales fisiológicamente aceptables en donde el compuesto reivindicado puede formar la especie negativa o positivamente cargada. Ejemplos de sales en las cuales el compuesto forma la fracción positivamente cargada incluyen, sin limitación, sales de amonio cuaternario (definidas en otra parte en la presente), sales tales como hidrocloreuro, sulfato, carbonato, lactato, tartrato, malato, maleato, succinato en donde el átomo de nitrógeno del grupo de amonio cuaternario es un nitrógeno del compuesto seleccionado de este invento el cual ha reaccionado con el ácido apropiado. Las sales en las cuales un compuesto de este invento forma la especie negativamente cargada incluyen, sin limitación, las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio formadas mediante la reacción de un grupo del ácido carboxílico en el compuesto con una base apropiada (ej., hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de calcio (Ca(OH))₂, etc.).

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para utilizar en el presente invento incluyen composiciones en donde los ingredientes activos son contenidos en una cantidad suficiente para lograr el propósito deseado, ej., la modulación de la actividad PK o el tratamiento o prevención de un trastorno relacionado con PK.

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

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de aquellos con experiencia en el estado la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en la presente.

Para cualquier compuesto utilizado en los métodos del invento, la dosis o cantidad terapéuticamente efectiva se puede estimar a partir de ensayos de cultivos celulares. Luego, la dosificación se puede formular para utilizar en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante que incluya el IC₅₀ tal como se determinó en cultivo celular (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición máxima media de

gus

la actividad PK.). Tal información se puede luego utilizar para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en humanos.

La toxicidad y eficacia terapéutica de los compuestos descritos en la presente se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, ej., al determinar el IC_{50} y el LD_{50} (ambos son discutidos en otra parte en la presente) para un compuesto en cuestión. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y estudios animales se pueden utilizar para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, ruta de administración y dosificación pueden ser elegidas por el médico individual dependiendo de la condición del paciente. (Ver, ej., Fingl, 1975, en "La Base Farmacológica de la Terapéutica", Ch. 1 p.1).

La cantidad e intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles de plasma de la especie activa los cuales son suficientes para mantener los efectos moduladores de la quinasa. Éstos niveles de plasma son conocidos como concentraciones efectivas mínimas (CEMs). La CEM variará para cada compuesto pero se puede estimar a partir de datos in vitro, ej., la concentración necesaria para lograr una inhibición de 50- 90% de una quinasa se puede indagar utilizando los ensayos descritos en la presente. Las dosificaciones necesarias para lograr la CEM dependerán de las características individuales y la ruta de administración. Se pueden utilizar ensayos HPLC o bioensayos para determinar concentraciones de plasma.

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

Actualmente, las cantidades terapéuticamente efectivas de los compuestos de la fórmula (I) pueden estar en el rango entre aproximadamente 0.25 mg/m^2 y 1500 mg/m^2 por día; preferiblemente aproximadamente $3 \text{ mg/m}^2/\text{día}$. Aún más preferiblemente 50 mg/día hasta 400 mg/día .

Cantidades terapéuticamente efectivas de inhibidor de la ciclooxigenasa están en el rango entre 0.1 mg y 10.000 mg aproximadamente para el tratamiento de las anteriores condiciones, con niveles preferidos de 1.0 mg y 1.000 mg aproximadamente.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con otros agentes anticancerígenos para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedero tratado y el modo particular de administración.

En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede no estar relacionada con la concentración de plasma y se pueden emplear otros procedimientos conocidos en el estado de la técnica para determinar el intervalo y la cantidad de dosificación correctos.

La cantidad de una composición administrada dependerá, naturalmente, del sujeto tratado, la severidad de la aflicción, la manera de administración, el criterio del médico, etc.

Si se desea, las composiciones se pueden presentar en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, el cual puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El paquete puede por ejemplo comprender lámina metálica o plástica, tal como un paquete blister. El paquete o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para administración. El paquete o dispensador también puede estar acompañado de una nota asociada con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de farmacéuticos, tal nota refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones para administración humana o veterinaria. Tal nota por ejemplo, podría ser del tipo de rotulación aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos para prescripción de fármacos o de un inserto informativo del producto aprobado. También se pueden preparar composiciones que comprenden un compuesto del invento formulado en un vehículo farmacéutico compatible colocadas en un recipiente apropiado, y rotuladas para tratamiento de una condición indicada. Condiciones apropiadas indicadas sobre el rótulo pueden incluir tratamiento de un tumor, inhibición de angiogénesis, tratamiento de fibrosis, diabetes, y similares.

También es un aspecto de este invento que un compuesto prescrito en la presente, o su sal o profármaco, se pueda combinar con otros agentes quimioterapéuticos para el

247

tratamiento de los trastornos y enfermedades discutidos anteriormente. Por ejemplo, un compuesto, sal o profármaco de este invento se puede combinar con agentes de alquilación tal como fluorouracilo (5- FU) solo o en combinación adicional con leucovorina; u otros agentes de alquilación tales como, sin limitación, otros análogos de pirimidina tales como

- 5 UFT, capecitabina, gemcitabina y citarabina, los sulfonatos de alquilo, ej., busulfan (utilizado en el tratamiento de leucemia granulocítica crónica), improsulfan y piposulfan; aziridinas, ej., benzodepa, carboquona, meturedepa y uredepa; etileniminas y metilmelaminas, ej., altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; y las mostazas de nitrógeno, ej. clorambucil
- 10 (utilizada en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia primaria y linfoma no Hodgkin, ciclofosfamida (utilizada el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer pulmonar, tumor de Wilm y rabdomiosarcoma), estramustina, ifosfamida, novembrichina, prednimustina y mostaza de uracilo (utilizada en el tratamiento de trombocitosis primaria,
- 15 linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin y cáncer ovárico); y triazinas, ej., dacarbazina (utilizada en el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos).

- Un compuesto, sal o profármaco de este invento también se puede utilizar en combinación con otros agentes quimioterapéuticos antimetabolitos tales como, sin limitación, análogos del ácido fólico, ej., metotrexato (utilizado el tratamiento de leucemia
- 20 linfocítica aguda, coriocarcinoma, cáncer de mama, micosis fungoide, cáncer de cabeza y cuello y sarcoma osteogénico) y pteropterina; y los análogos de purina tales como mercaptopurina y tioguanina los cuales encuentran uso en el tratamiento de leucemias granulocíticas agudas, linfocíticas agudas, y granulocíticas crónicas.

- Se contempla que un compuesto, sal o profármaco de este invento se puede utilizar
- 25 en combinación con agentes quimioterapéuticos basados en productos naturales tales como, sin limitación, los alcaloides vinca, ej. vinblastina (utilizado en el tratamiento de cáncer de mama y cáncer testicular), vincristina y vindesina; las epipodofilotoxinas, ej., etoposide y teniposide, ambas útiles en el tratamiento de cáncer testicular y sarcoma de Kaposi; los agentes quimioterapéuticos antibióticos, ej., daunorubicina, doxorubicina, epirubicina,
- 30 mitomicina (utilizados para tratar cáncer pancreático, de estómago, cervix, colon, mama, y

1248

vejiga), dactinomicina, temozolomida, plicamicina, bleomicina (utilizados en el tratamiento de cáncer de piel, esófago y tracto genitourinario); y los agentes quimioterapéuticos enzimáticos tales como L- asparaginasa.

Además, un compuesto, sal o profármaco de este invento también se puede utilizar en combinación con complejos de coordinación de platino (cisplatina, etc.); ureas sustituidas tal como hidrox urea; derivados de metilhidrazina, ej., procarbazina; supresores adrenocorticales, ej., mitotano, aminoglutetimida; y hormona y antagonistas de hormonas tales como los adrenocorticosteroides (ej., prednisona), progestinas (ej., hidroxiprogesterona, caproato); estrógenos (ej., dietilstilbesterol; antiestrógenos tales como tamoxifen; andrógenos, ej., propionato de testosterona; e inhibidores de aromatasa tales como anastrozol. Otros agentes antineoplásicos conocidos en el estado de la técnica se pueden utilizar junto con la terapia de combinación del presente invento. Ejemplos de estos agentes antineoplásicos y otros son dados en la solicitud de patente de los Estados Unidos Serial No. 60/113.786, registrada en Diciembre 23 de 1998, y Publicación de Solicitud PCT No. WO 00/38716 la divulgación de esta incorporada en la presente como referencia.

Finalmente, también se contempla que la combinación de un compuesto de este invento será efectiva en combinación con mitoxantrona o paclitaxel para el tratamiento de cánceres de tumores sólidos o leucemias tales como, sin limitación, leucemia mielógena aguda (no linfocítica).

EJEMPLOS

Ejemplos Sintéticos

Las siguientes preparaciones y ejemplos son proporcionados para permitir a aquellos con experiencia en el estado de la técnica entender de manera más clara y practicar el presente invento. Estos no se deben considerar como limitantes del alcance del invento, sino como meramente ilustrativos y representativos del mismo.

SÍNTESIS DEL INHIBIDOR DE LA PROTEINQUINASA DE LOS COMPUESTOS DE LA FÓRMULA (I) DEL PRESENTE INVENTO

249

Procedimiento Sintético General:

La siguiente metodología general se puede emplear para preparar los compuestos de este invento:

2- oxindol adecuadamente sustituido (1 equiv.), aldehído adecuadamente sustituido (1.2 equiv.) y una base (0.1 equiv.) son mezclados en un solvente (1- 2 ml/mmol de 2- oxindol) y luego la mezcla es calentada entre 2 y 12 horas aproximadamente. Después de enfriar, el precipitado que se forma es filtrado, lavado con etanol frío o éter y secado al vacío para proporcionar el producto crudo. Si no se forma precipitado, la mezcla de reacción es concentrada y el residuo es triturado con diclorometano/éter, el sólido resultante es recolectado mediante filtración y luego es secado. Opcionalmente el producto se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía.

La base puede ser una base orgánica o inorgánica. Si se utiliza una base orgánica, esta preferiblemente es una base de nitrógeno. Ejemplos de bases de nitrógeno orgánicas incluyen, pero no están limitadas a diisopropilamina, trimetilamina, trietilamina, anilina, piridina, 1,8- diazabicyclo[5.4.1]undec- 7- eno, pirrolidina y piperidina.

Ejemplos de bases y orgánicas son, sin limitación, amoníaco, hidróxidos metal alcalinos o alcalinotérreos, fosfatos, carbonatos, bicarbonatos, bisulfatos y amidas. Los metales alcalinos incluyen, litio, sodio y potasio mientras los alcalinotérreos incluyen calcio, magnesio y bario.

En una realización actualmente preferida de este invento, cuando el solvente es un solvente aprótico, tal como agua o alcohol, la base es una base inorgánica alcalinotérrea o metal alcalina, preferiblemente, un hidróxido metal alcalino o alcalinotérreo.

Será claro para aquellos con experiencia en el estado de la técnica, con base tanto en los principios generales conocidos de síntesis orgánica como en las divulgaciones en la presente, cual base sería la más apropiada para la reacción contemplada.

El solvente en el cual la reacción es realizada puede ser un solvente prótico o aprótico, preferiblemente es un solvente prótico. Un "solvente prótico" es un solvente que tiene los átomos covalentemente unidos a átomos de oxígeno o nitrógeno lo cual hace los átomos de hidrógeno apreciablemente ácidos y por lo tanto capaces de ser "compartidos"

con un soluto a través de enlaces de hidrógenos. Ejemplos de solventes próticos incluyen, sin limitación, agua y alcoholes.

Un "solvente aprótico" puede ser polar o no polar pero, en cualquier caso, no contiene hidrógenos ácidos y por lo tanto no es capaz de formar enlaces de hidrógeno con los solutos. Ejemplos, sin limitación, de solventes apróticos no polares, son pentano, hexano, benceno, tolueno, cloruro de metileno y tetracloruro de carbono. Ejemplos de solventes apróticos polares son cloroformo, tetrahidrofurano, dimetilsulfoxido y dimetilformamida.

En una realización actualmente preferida de este invento, el solvente es un solvente prótico, preferiblemente agua o alcohol tal como etanol.

La reacción es realizada a temperaturas mayores que la temperatura ambiente. La temperatura está generalmente entre 30 y 150°C aproximadamente, preferiblemente entre 80 y 100°C aproximadamente, más preferiblemente entre 75 y 85°C aproximadamente, lo cual es aproximadamente el punto de ebullición del etanol. Por "aproximadamente" se entiende que el rango de temperatura esta preferiblemente dentro de 10 grados Celsius de la temperatura indicada, más preferiblemente dentro de 5°C de la temperatura indicada y, lo más preferible, dentro de 2°C de la temperatura indicada. Por lo tanto, por ejemplo, por "75°C aproximadamente" se entiende 75°C $\pm$ 10°C, preferiblemente 75°C $\pm$ 5°C y lo más preferiblemente, 75°C $\pm$ 2°C.

2- oxindoles y aldehídos, pueden ser fácilmente sintetizados utilizando técnicas bien conocidas en las artes químicas. Se apreciará por aquellos con experiencia en el estado de la técnica que otras rutas sintéticas para la formación de compuestos del invento son disponibles y que lo siguiente se ofrece a manera de ejemplo y no como limitación.

Método A: Formilación de pirroles

Se agregó por goteo POCl₃ (1.1 equiv.) a dimetilformamida (3 equiv.) a -10°C seguido por la adición de la pirrol apropiada disuelta en dimetilformamida. Después de agitar durante dos horas, la mezcla de reacción es diluida con H₂O y basificada a pH 11 con KOH 10 N. El precipitado que se forma es recolectado mediante filtración, lavado con H₂O y secado en un horno al vacío para proporcionar el aldehído deseado.

251

Método B: saponificación de ésteres de ácidos pirrol carboxílicos

Una mezcla de un éster del ácido pirrolcarboxílico y KOH (2- 4 equiv) en EtOH es sometida a reflujo hasta que la terminación de la reacción es indicada mediante
5 cromatografía de capa delgada (TLC). La mezcla de reacción fría es acidificada a pH 3 con HCL 1N. El precipitado que se forma es recolectado mediante filtración, lavado con H₂O y secado en un horno al vacío para proporcionar el ácido pirrolcarboxílico.

Método C: Amidación

10 A una solución agitada de un ácido pirrolcarboxílico 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 es agitada hasta que la terminación es indicada mediante TLC. Luego se agrega acetato de etilo a la mezcla de reacción y la solución es lavada con NaHCO₃
15 saturado y salmuera (con sal extra), secada sobre MgSO₄ anhidro y concentrada para proporcionar la amina desecada.

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

20 Una mezcla del oxindol (1 equivalente), 1 equivalente del aldehído y 1 – 3 equivalentes de piperidina (o pirrolidina) en etanol (0.4 M) es agitada a 90- 100°C hasta que la terminación de la reacción es indicada por TLC. Luego la mezcla es concentrada y el residuo acidificado con HCl 2N. El precipitado que se forma es lavado con H₂O y EtOH y luego es secado en un horno al vacío para proporcionar el producto.

25

Método E: Condensación de aldehídos y oxindoles que no contienen sustituyentes de ácido carboxílico

Una mezcla del oxindol (1 equivalente), 1 equivalente del aldehído y 1 –3 equivalentes de piperidina (o pirrolidina) en etanol (0.4 M) es agitada a 90- 100°C hasta que
30 la terminación de la reacción es indicada mediante TLC. La mezcla es enfriada a

temperatura ambiente y el sólido que se forma es recolectado mediante filtración al vacío, lavado con etanol y secado para proporcionar el producto. Si no se forma un precipitado al enfriar la mezcla de reacción, la mezcla es concentrada y purificada mediante cromatografía en columna.

5

C. Ejemplos de síntesis de oxindol

Los siguientes ejemplos de síntesis de oxindoles representativos no se deben interpretar como limitantes del alcance de este invento en ninguna forma. Rutas alternativas a los oxindoles mostrados así como también otros oxindoles a ser utilizados para la preparación de los compuestos de este invento serán manifiestos para aquellos expertos en el estado de la técnica con base en las siguientes divulgaciones. Tales síntesis y oxindoles están dentro del alcance y espíritu de este invento.

10

5- amino- 2- oxindol

15

5- Nitro- 2- oxindol (6.3 g) fue hidrogenado en metanol sobre paladio al 10% sobre carbono para proporcionar 3.0 g (rendimiento del 60%) del compuesto del título como un sólido blanco.

5- Bromo- 2- oxindol

20

2- Oxoindol (1.3 g) en 20 mL de acetonitrilo fue enfriado hasta -10°C y se agregó 2.0 g de N- bromosuccinimida lentamente con agitación. La reacción fue agitada durante 1 hora a -10°C y 2 horas a 0°C . El precipitado fue recolectado, lavado con agua y secado para proporcionar 1.9 g (rendimiento del 90%) del compuesto del título.

25 4- Metil- 2- oxindol

30

Se agregó 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 fue enfriada en un baño helado y se agregó 20 mL de 3- nitro- o- xileno en 20 mL de éter seco. La mezcla lodosa de color rojo oscuro fue calentada a reflujo durante 0.5 horas, concentrada a un sólido rojo oscuro, y tratada con hidróxido de sodio al 10% hasta que casi todo el sólido se disolvió. La

253

mezcla de color rojo oscuro fue tratada con peroxido de hidrógeno al 30% hasta que el color rojo cambio a amarillo. La mezcla fue tratada alternativamente con hidróxido de sodio al 10% y peroxido de hidrógeno al 30% hasta que el color rojo ya no estuvo presente. El sólido fue filtrado y el filtrado fue acidificado con ácido clorhídrico 6N. El precipitado resultante fue recolectado mediante filtración al vacío, lavado con agua, y secado al vacío para proporcionar 9.8 g (rendimiento del 45%) de ácido 2- metil- 6- nitrofenilacético como un sólido blancuzco. El sólido fue hidrogenado en metanol sobre paladio al 10% sobre carbono para proporcionar 9.04 g del compuesto del título como un sólido blanco.

10 **7- Bromo- 5- cloro- 2- oxindol**

5- cloro- 2- oxindol (16.8 g) y 19.6 g de N- bromosuccinimida fueron suspendidos en 140 mL de acetonitrilo y sometidos a reflujo durante 3 horas. La cromatografía de capa delgada (sílice, acetato de etilo) a las dos horas del reflujo mostró 5- cloro- 2- oxindol o N- bromosuccinimida (R_f 0.8), producto (R_f 0.85) y un segundo producto (R_f 0.9) cuya proporción no cambio después de otra hora de reflujo. La mezcla fue enfriada a 10°C, el precipitado fue recolectado mediante filtración al vacío, lavado con 25 mL de etanol succionado hasta secarse durante 20 minutos en el embudo para proporcionar 14.1 g del producto húmedo (rendimiento del 56%). El sólido fue suspendido en 200 mL de etanol desnaturalizado y lavado con lechada mediante agitación y con reflujo durante 10 minutos. La mezcla fue enfriada en un baño helado a 10°C. El producto sólido fue recolectado mediante filtración al vacío, lavado con 25 mL de etanol y secado bajo vacío a 40°C para proporcionar 12.7 g (rendimiento del 51%) de 7- bromo- 5- cloro- 2- oxindol.

5- Fluoro- 2- oxindol

25 Se disolvió 5- fluoroisatina (8.2 g) en 50 mL de hidrato de hidrazina y se sometió a reflujo durante 1.0 horas. Luego las mezclas de reacción fueron vertidas en agua. Luego el precipitado fue filtrado, lavado con agua y secado en un horno al vacío para proporcionar el compuesto del título.

30 **5- Nitro- 2- oxindol**

254

Se disolvió 2- oxindol (6.5 g) en 25 mL de ácido sulfúrico concentrado y la mezcla se mantuvo entre -10 y -15 °C mientras se agregó por goteo 2.1 mL de ácido nítrico fumante. Después de la adición del ácido nítrico la mezcla de reacción fue agitada a 0°C durante 0.5 horas y vertida en agua helada. El precipitado fue recolectado mediante filtración, lavado con agua y cristalizado a partir de ácido acético al 50%. Luego el producto cristalino fue filtrado, lavado con agua y secado al vacío para proporcionar 6.3 g (70%) de 5- nitro- 2- oxindol.

5- aminosulfonil- 2- oxindol

A una matraz de 100 mL cargada con 27 mL de ácido clorosulfónico se agregó lentamente 13.3 g de 2- oxindol. La temperatura de reacción fue mantenida por debajo de 30°C durante la adición. Después de la adición la mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 1.5 horas, calentada a 68°C durante 1 hora, enfriada, y vertida en agua. El precipitado fue lavado con agua y secado en un horno al vacío para proporcionar 11.0 g de 5- clorosulfonil- 2- oxindol (rendimiento del 50%) el cual fue utilizado sin purificación adicional.

Se agregó 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 fue concentrada y el sólido fue recolectado mediante filtración al vacío para proporcionar 0.4 g (rendimiento del 20%) del compuesto del título como un sólido blancuzco.

5- isopropilaminosulfonil- 2- oxindol

A una matraz de 100 mL cargada con 27 mL de ácido clorosulfónico se agregó lentamente 13.3 g de 2- oxindol. La temperatura de reacción fue mantenida por debajo de 30°C durante la adición. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 1.5 horas, calentada a 68°C durante 1 hora, enfriada y vertida en agua. El precipitado formado fue filtrado, lavado con agua y secado en un horno al vacío para proporcionar 11.0 g (50%) de 5- clorosulfonil- 2- oxindol el cual fue utilizado sin purificación adicional.

Una suspensión de 3g de 5- clorosulfonil- 2- oxindol, 1.15 g de isopropilamina y 1.2 mL de piridina en 50 mL de diclorometano fue agitada a temperatura ambiente durante 4

295

horas tiempo durante el cual se formó un sólido blanco. El sólido fue recolectado mediante filtración al vacío, lavado en pasta aguada con etanol caliente, enfriado, recolectado mediante filtración al vacío y secado al vacío a 40°C durante la noche para proporcionar 1.5 g (45% de 5- isopropilaminosulfonil- 2- oxindol.

5 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- D_6) δ 10.69 (s, br, 1H, NH), 7.63 (dd, $J=2$ y 8Hz, 1H), 7.59 (d, $J=2$ Hz, 1H), (d, $J=7$ Hz, 1H, NH- SO_2 -), 6.93 (d, $J=8$ Hz, 1H), 3.57 (s, 2H), 3.14-3.23 (m, 1H, CH-(CH_3) $_2$), 0.94 (d, $J=7$ Hz, 6H, 2x CH_3).

5- fenilaminosulfonil- 2- oxindol

10 Una suspensión de 5- clorosulfonil- 2- oxindol (1.62g, 7 mmol), anilina (0.782 mL, 8.4 mmol) y piridina (1 mL) en diclorometano (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción fue diluida con acetato de etilo (300 mL) y acidificada con ácido clorhídrico 1N (16 mL). La capa orgánica fue lavada con bicarbonato de sodio y salmuera, secada y concentrada. El residuo fue lavado con etanol (3 mL) y luego
15 cromatograficado sobre gel de sílice eluyendo con metanol/diclorometano 1:9 para proporcionar 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).

20

Piridin- 3- ilamida del ácido 2- Oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 5- sulfónico

Una solución de 5- clorosulfonil- 2- oxindol (3 g) y 3- aminopiridina (1.46 g) en piridina (15 mL) fue agitada a temperatura ambiente durante la noche tiempo en el cual un sólido café estuvo presente. El sólido fue filtrado, lavado con etanol y secado al vacío para
25 rendir 1.4 g (38%) de piridin- 3- ilamina del 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).

30 MS m/z (APCI+) 290.2.

5- Feniloxindol

Se disolvió 5- bromo- 2- oxindol (5g, 23.5 mmol) en 110 mL de tolueno y 110 mL de etanol con agitación y un poco de calor. Se agregó tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (1.9 g, 1.6 mmol) seguido por 40 mL (80 mmol) de carbonato de sodio acuoso 2M. A esta mezcla se agregó ácido benceno borónico (3.7g, 30.6 mmol) y la mezcla se calentó en un baño de aceite a 100°C durante 12 horas. La reacción fue enfriada, diluida con acetato de etilo (500 mL), lavada con bicarbonato de sodio saturado (200 mL), agua (200 mL), HCl 1N (200 mL) y salmuera (200 mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de magnesio y concentrada para proporcionar un sólido café. La trituración con diclorometano proporcionó 3.8 g (77%) de 5- fenil- 2- oxindol como un sólido de color canela.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.4 (br s, 1H, NH), 7.57 (dd, J=2 1.8 y 7.2 Hz, 1H), 7.5 a 7.35 (m, 5H), 7.29 (m, 1H), 6.89(d, J=8.2 Hz, 1H), 3.51 (s, 2H, CH₂CO).

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-d₆) δ 10.46 (br, 1H, NH), 7.64 (d, J=2 1.8 Hz, 1H), 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-d₆) δ 10.39 (s, 1H, NH), 7.49 (d, J=2 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=1.51 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H, CH₂CO), 2.60 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.32 (M, 2H, CH₂), 0.9 (t, J= 7.5 Hz, 3H, CH₃).

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

257

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.29 (br, 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, OCH₃), 3.47 (s, 2H, CH₂CO), 2.86 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.19 (d, J=6.8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).
MS-EI m/z 281 [M⁺].

5

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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), 7.17 (dd, J=1.6 & 7.5 Hz, 1H), 6.99 (d, J=1.6 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H, CH₂CO), 2.63 (q, J=7.6 Hz, 2H, CH₂CH₃),
10 1.20 (t, J=7.6 Hz, 3H, CH₂CH₃).
MS-EI m/z 237 [M⁺].

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.37 (br s, 1H, NH), 7.43 (m, 1H), 7.35-7.39 (m, 1H),
15 7.17-7.27 (m, 3H), 7.01 (d, J=1.8 Hz, 1H), 3.49 (s, 2H, CH₂CO), 2.95 (m, 1H, CH(CH₃)₂),
1.24 (d, J=6.8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).
MS-EI m/z 251 [M⁺].

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.28 (br s, 1H, NH), 7.17 (m, 2H), 6.93 (dd, J=1.6 &
20 7.6 Hz, 1H), 6.86 (d, J=2.4 Hz, 1H), 6.58 (dd, J=2.4 & 8.5 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H, OCH₃),
3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.45 (s, 2H, CH₂CO).
MS-EI m/z 269 [M⁺].

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.51 (s, 1H, NH), 8.81 (d, J=2.5 Hz, 1H), 8.55 (dd,
25 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, CH₂CO).
MS m/z 210 [M⁺].

30

(3-cloro-4-etoxifenil)-amida del 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 agregó 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 fue agitada a temperatura ambiente durante 72 horas. Luego la reacción fue diluida con acetato de etilo (300 mL), lavada con bicarbonato de sodio saturado (100 mL), agua, ácido clorhídrico 2N (100 mL), agua (3x200 mL) y salmuera. Luego se seco sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo fue triturado con acetato de etilo para proporcionar (3- cloro- 4- metoxifenil)- amida del ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 4- carboxílico como un sólido rosado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) 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), 3.38 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 2H, CH₂).

MS-EI *m/z* 316 [M]⁺.

4- carboxi- 2- oxindol

Una solución de trimetilsilildiazometano en hexano (2M) se agregó por goteo a una solución de 2.01 g de 2- cloro- 3- carboxi- nitrobenzono en 20 mL de metanol a temperatura ambiente hasta que no ocurrió evolución adicional de gas. Luego se agregó ácido acético para apagar el trimetilsililazometano de exceso. La mezcla de reacción fue evaporada al vacío y el residuo fue secado en un horno durante la noche. El 2- cloro- 3- metoxycarbonilnitrobenzono obtenido fue suficientemente puro para la siguiente reacción.

Se agregó malonato de dimetilo (6.0 mL) a una suspensión helada de 2.1 g de hidruro de sodio en 15 mL de DMSO. La mezcla de reacción fue agitada a 100°C durante 1 hora y luego enfriada a temperatura ambiente. Se agregó 2- cloro- 3- metoxycarbonilnitrobenzono (2.15 g) en una porción y la mezcla fue calentada a 100°C durante 1.5 horas. Luego, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente, vertida en agua helada, acidificada a pH 5 y extraída con acetato de etilo. La capa orgánica

2581

fue lavada con salmuera, secada sobre sulfato de sodio anhidro y concentrada para proporcionar 3.0 g de 2- metoxycarbonil- 6- nitrofenil- malonato de dimetilo.

2- metoxycarbonil- 6- nitrofenil- malonato de dimetilo (3.0 g) fue sometido a reflujo en 50 mL de ácido clorhídrico 6 N durante la noche. La mezcla fue concentrada hasta sequedad, se agregó 20 mL de etanol y 1.1 g de cloruro de estaño (II) y la mezcla fue sometida a reflujo durante 2 horas. La mezcla fue filtrada a través de Celite, concentrada y cromatografada sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo:hexano:ácido acético como eluyente para proporcionar 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), 3.67 (s, 2H).

D. Síntesis de 2-indolinonas pirrol-sustituidas

Ejemplo 1

Acido 4- metil- 5- (2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico
Éster etílico del ácido 4- metil- 2- pirrolicarboxílico (comercialmente disponible) fue formulado utilizando el método A para proporcionar (73%) éster etílico del ácido 5- formil- 4- metil- 2- pirrolicarboxílico. Luego este fue hidrolizado utilizando el método B para proporcionar el ácido 5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (58%).

El oxindol (133mg, 1 mmol) fue condensado con el ácido 5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (153 mg) utilizando el método D para proporcionar 268 mg (100%) del compuesto del título como un sólido de color naranja-rojo.

¹HNMR (360 MHz, DMSO- d₆) 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, CH₃).
MS (modo negativo) 266.8 [M- 1]⁺.

Ejemplo 2

Acido 4- metil- 5- (1- metil- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico

260

1- metil- 1,3- dihidroindol- 2- ona(147 mg, 1 mmol) fue condensado con el ácido 5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (153 mg) utilizando el método D para proporcionar 250 mg (86%) del compuesto del título.

¹HNMR (360 MHz,DMSO- d₆)δ 13.82 (s, br, 1H, NH), 12.88 (s, br, 1H, 7.83 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H, H- vinilo), 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,CH₃).
MS m/z 283.0 [M- 1]⁺.

Ejemplo 3

10 Éster metílico del ácido 4- metil- 5- (2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico

Se condensó oxidol (105 mg, 0.79 mmol) con éster metílico del ácido 5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (110 mg,0.97 mmol) utilizando el método E para proporcionar 153.2 mg (81%) del compuesto del título.

15 ¹HNMR (360 MHz,DMSO- d₆)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- vinilo), 7.2 (dt,J=1.2 & 7.7 Hz, 1H), 7.01 (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]⁺.

20 Ejemplo 4

Éster etílico del ácido 5- (5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico

5- cloro- 1,3- dihidroindol- 2- ona (2.22g, 13.2 mmol) fue condensado con éster etílico del ácido 5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (2.43 g) utilizando el método E para proporcionar 4.1 g (94%) del compuesto del título como un sólido naranja.

25 ¹HNMR (360 MHz,DMSO- d₆)δ 13.95 (s, br, 1H, NH),7.98 (d, J=2.2 Hz, 1H, H- 4), 7.78 (s, 1H, H- vinilo), 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, OCH₂CH₃), 1.29 (t, J= 7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

261

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

Ejemplo 5

Acido 5- (5- cloro- 2- oxo- 1,2 -dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

Una mezcla de éster etílico del ácido 5- (5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (1.3 g, mmol) e hidróxido de potasio en metanol (25 mL) y etanol (25 mL) fue calentada hasta reflujo durante la noche. Los materiales insolubles fueron removidos mediante filtración y la mezcla fue neutralizada con ácido clorhídrico 6N para proporcionar 0.876 g (70%) del compuesto del título.

^1H NMR (360 MHz,DMSO- d_6) δ 12.90 (s, br, 1H, COOH),11.06 (s, br,1H, HN), 8.02 (d, J =1.8 Hz, 1H, H- 4), 7.81 (s, 1H, H- vinilo), 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 Hz, 1H, H- 3'), 2.35 (s,3H, CH_3).

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- ilidenmetil)- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.16 g, 0.76 mmol) fue condensado con (3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (0.2 g; preparado mediante el método C) para proporcionar 60 mg (17%) del compuesto del título como un sólido de color naranja.

^1H NMR (300 MHz,DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH),11.02 (s, br,1H, HN), 8.42 (t, J =5.8 Hz, 1H, CONH CH_2), 8.12 (d, J =1.8 Hz, 1H, H- 4), 7.78 (s, 1H- vinilo), 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, CH_2), 2.38- 2.43 (m, 6H,3x CH_2), 2.35 (s, 3H, CH_3), 1.62- 1.71 (m,6H, 3x CH_2)

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

Ejemplo 7

262

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

5 5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.16 g, 0.75 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (0.2 g, preparado mediante el método C) para proporcionar 30 mg (8%) del compuesto del título como un sólido naranja.

¹HNMR (300 MHz,DMSO- d₆)δ 13.61 (s, br, 1H, NH),11.02 (s, br,1H, HN), 8.40 (m,1H, CONHCH₂), 8.12 (d, J=1.5 Hz, 1H, H- 4), 7.78 (s, 1H- 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=7.1Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS- El m/z 458 y 460g [M⁺- 1 y M⁺+2]

Ejemplo 8

15 **(2- dietilaminoetil) amida del ácido5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico**

20 5- bromo- 1,3- dihidro- 2- ona (212 mg, 1 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (preparado a partir de pirrol- 2- carboxilato de etilo mediante los métodos A, B y luego C) para proporcionar 162 mg del compuesto del título.

¹HNMR (300 MHz,DMSO- d₆)δ 13.53 (s, br, 1H, NH),11.06 (s, br,1H, HN), 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).

25 MS- Elm/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- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico

963

6- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (209 mg, 1mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 1H- pirrol- 2- carboxílico para proporcionar 182 mg (42%) del compuesto del título.

¹HNMR (300 MHz,DMSO- d6)δ 13.56 (s, br, 1H, NH),11.06 (s, br,1H, HN), 8.36 (t,1H, CONHCH₂), 7.77 (s, 1H- vinilo), 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 Hz, 6H N(CH₂CH₃)₂).
MS- EI m/z 428 [M⁺]

10 Ejemplo 10

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

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (212 mg, 1 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) metilamida del ácido 5- formil- 1H- pirrol- 2- carboxílico para proporcionar 15 246 mg (55%) del compuesto del título.

¹HNMR (360 MHz,DMSO- d6)δ 13.54 (s, br, 1H, NH),11.06 (s, br,1H, HN), 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, CH₂), 3.25 (s, br,3H, NCH₃), 2.57 (t, J=6.5 Hz, 2H, CH₂), 2.45 (m,4H, N(CONHCH₂), 0.91 (m, 6H,N(CH₂CH₃)₂).

20 MS- EI m/z 444 [M⁺ - 1 y M⁺+1]

Ejemplo 11

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

25 6- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (209 mg, 1 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) metilamida del ácido 5- formil- 1H- pirrol- 2- carboxílico para proporcionar 277 mg (63%) del compuesto del título.

¹HNMR (360 MHz,DMSO- d6)δ 13.58 (s, br, 1H, NH),11.04 (s,1H, HN), 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), 6.78

264

(m, 1H), 3.55 (s, br, 2H, CH₂), 3.25 (s, br, 3H, NCH₃), 2.58 (t, 2H, CH₂), 2.44 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0.92 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Ejemplo 12

5 (3- dietilaminopropil) amida del ácido 3- metil- 5- (2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico

10 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 éster etílico del ácido 3- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico mediante el método B luego C) para proporcionar 39 mg (21%) del compuesto del título.

¹HNMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.34 (s, br, 1H, NH), 10.88 (s, br, 1H, HN), 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), 3.26- 3.32 (m, 2H, CH₂), 2.41- 2.48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂) 2.29 (s, 3H, CH₃) 1.63 (m, 2H, CH₂), 0.93 (t, J=7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

15 MS- EI m/z 380 [M⁺]

Ejemplo 13

(3- dietilamino- propil) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

20 5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (106 mg, 0.5 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico para proporcionar 35 mg (15%) del compuesto del título.

¹HNMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.35 (s, br, 1H, NH), 11.00 (s, br, 1H, HN), 7.89 (d, J=1.9 Hz, 1H, H- 4), 7.80 (s, 1H, H- vinilo), 7.74 (t, J=5.3 Hz, 1H, CONHCH₂), 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, CH₂), 2.41- 2.48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.63 (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⁺].

30 **Ejemplo 14**

965

(3- dietilaminopropil) amida del ácido 3- metil- 5- (2- oxo- 6- fenil- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico

6- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (105 mg, 0.5 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) metilamida del ácido 5- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico para proporcionar 67.8 mg (30%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.37 (s, br, 1H, NH), 11.00 (s, br, 1H, HN), 7.23- 7.73 (m, 11H), 3.29 (m, 2H, CH₂), 2.41- 2.48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.64 (m, 2H, CH₂), 0.94 (t, J=7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

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

10

Ejemplo 15

(3- dietilamino- propil) amida del ácido 5- (5- metoxi- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

5- metoxi- 1,3- dihidroindol- 2- ona (82.5 mg, 0.5 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico para proporcionar 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, HN), 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, OCH₃), 3.28 (m, 2H, CH₂), 2.41- 2.48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.63 (m, 2H, CH₂), 0.93 (t, J=7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

20

MS m/z 410 [M^+].

Ejemplo 16

(3- dietilamino- propil) amida del ácido 5- (6- metoxi- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

25

6- metoxi- 1,3- dihidroindol- 2- ona (82.5 mg, 0.5 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico para proporcionar 63 mg (31%) del compuesto del título.

¹HNMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.22 (s, br, 1H, NH), 10.86 (s, br, 1H, HN), 7.39-7.63 (m, 6H), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.3 (m, 2H, CH₂), 2.45 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2.28 (s, 3H, CH₃), 1.63 (m, 2H, CH₂), 0.93 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

5 Ejemplo 17

(2- dietilamino- etil) amida del ácido 3- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico

Éster etílico del ácido 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico (May, Donald A; Lash, Timothy D; *J. Org. Chem.*, 1992, 57: 18, 4820- 4828) fue formilado utilizando el método A luego B para proporcionar ácido 3- formil- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (1.43 g, 6.8 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 3- formil- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico (1.97 g) para proporcionar 2.2 g (67%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo-naranja.

¹HNMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.47 (s, 1H, NH), 11.0 (s, 1H, HN), 8.0 (d, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, CH), 7.28 (dd, J= 2.1 y 8.2 Hz, ArH), 7.16 (m, 1H, ArH), 6.8 (d, J=8.3 HZ, ArH), 3.3 (s, 2H, CONH), 2.5 (m, 6H, 3xCH₂), 2.78 (br, m, 2H, pirrol CH₂), 2.72 (br, 2H, pirrolCH₂), 1.7 (br m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1.74 (br s, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₃)₂, 0.96 (t, J= 7.4 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS- EI m/z 484 y 486 [M⁺- 1 y M⁺+1]

Ejemplo 18

(3- dietilamino- propil) amida del ácido 3- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (20 g, 0.1 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 3- formil- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico (30 g) para proporcionar 33 g (46%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

267

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 10.9 (s, 1H, NH), 8.0 (m, 1H, HN), 7.86 (m, 1H, ArH), 7.4 (m, 1H, ArH), 7.29 (d, J = 1.9 y 8.5 Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, J = 8 Hz, 1H, ArH), 2.7 (br m, 4H, 2xNCH₂), 2.4 (m, 8H, 4xNCH₂), 1.7 (br, m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1.6 (br, m, 2H, pirrol CH₂), 2.72 (br, 2H, pirrol CH₂), 1.7 (br m, 2H, CH₂CH₂CH₂)₂, 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS- EI *m/z* 499 y 501 [M⁺ y M⁺+2]

Ejemplo 19

(3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 3- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (80 mg, 0.4 mmol) fue condensado con (3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 3- formil- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico (120 g) para proporcionar 43 g (22%) del compuesto del título como un sólido de canela - naranja.

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.4 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, HN), 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, 2xNCH₂), 2.8 (m, 4H, 2xpirrol CH₂), 2.5 (br m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1.6 (br m, 2xpirrol CH₂CH₂ CH₂CH₂CH₂ y CONHCH₂).

MS- EI *m/z* 497 y 499 [M⁺ y M⁺+2].

Ejemplo 20

(2- dietilaminoetil) amida del ácido 3- (2- oxo- 6- piridin- 3- il- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico

6- piridin- 3- il- 3- dihidroindol- 2- ona (60 mg, 0.4 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 3- formil- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico (80 mg) para proporcionar 50 mg (38%) del compuesto del título como un sólido rojizo.

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.4 (s, 1H, NH), 11 (s, 1H, HN), 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, 2xpirrol CH₂),

268

2.5 (br m, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$ y NCH_2), 1.75 (br s, 4H, $2 \times \text{pirrol}CH_2CH_2$), 0.9 (t, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

MS- EI m/z 484 [M^+].

5 Ejemplo 21

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

A una mezcla de cloruro de benzoilo (1 equiv.) y cloruro de aluminio (1 equiv.) en diclorometano a 0° C se agregó 3,5- dimetil- 2- pirrolicarboxilato de etilo (1 equiv.). La
10 mezcla fue agitada a 80° C durante 4 hr. Luego la mezcla fue extraída con acetato de etilo (EtOAc) y H₂O. Los extractos orgánicos combinados fueron lavados con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, secados y concentrados para proporcionar (51%) del ácido 4- benzoil- 3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2- carboxílico.

Una mezcla de éster etílico del ácido 4- benzoil- 3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2-
15 carboxílico (4.13 g, 15.2 mmol) y nitrato de amonio cérico (33 g, 4equiv.) en 50 mL de tetrahidrofurano (THF): ácido acético (HOAc): H₂O 1: 1: 1 fue sometida a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción fue luego enfriada, extraída con EtOAc y basificada a pH 9 con carbonato de sodio. La capa orgánica fue luego lavada con salmuera, secada (MgSO₄) y concentrada después mediante cromatografía en columna para proporcionar
20 3.25 g (75%) de éster etílico del ácido 4- benzoil- 5- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico como un sólido amarillo.

5- bromo- 1,3- dihidro- indol- 2- ona fue condensada con ácido 4- benzoil- 5- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico utilizando el método D para proporcionar el
ácido 4- benzoil- 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H-
25 pirrol- 2- carboxílico.

Luego el anterior ácido carboxílico fue acoplado con N,N- dietil- 1,3- propanodiamina utilizando el método C para proporcionar el compuesto del título.

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) 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).

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

5 Ejemplo 22

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 14.10 (s, 1H, CONHCH₂), 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, H₆), 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- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 2- carboxílico

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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- vinilo), 7.17 (m, 1H), 6.92 (m, 1H), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.44 (m, 6H, 3xCH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.65- 1.75 (m, 6H, 3xCH₂).

Ejemplo 24

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 14.01 (s, 1H, NH), 11.18 (br s, 1H, NH), 7.98 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (m, 2H), 6.68 (m, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.33 (dd, J= 2.0 & 8.2 Hz, 1H, H₆), 6.84 (d, J=8.2 Hz, 1H, H- 7), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.42- 2.47 (m, 6H, 3xCH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.64 (m, 4H, 2xCH₂).

Ejemplo 25

290

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

¹H NMR (300 MHz,DMSO- d6)δ 14.15 (s,1H, NH),11.16 (br s, 1H, NH), 7.98 (m,1H, CONHCH₂), 7.77 (d,J=7.7Hz, 2H), 7.69 (m, 1H), 7.53- 7.63 (m, 4H), 7.44 (m, 2H),
 5 7.33- 7.37 (m, 2H), 7.24 (s, 2H), 7.12 (s, 1H), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.43- 2.48 (m, 6H, 3xCH₂), 2.12(s, 3H, CH₃), 1.74 (m,4H,CH₂), 1.69 (m, 4H, 2xCH₂).
 Impacto electrónico MS m/z 558 [M⁺]

Ejemplo 26

10 (3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 4- benzoil- 5- (6- metoxi- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

¹H NMR (300 MHz,DMSO- d6)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- vinilo), 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),
 15 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (m, 2H, CH₂), 2.42- 2.46 (m, 6H, 3xCH₂), 2.10(s, 3H, CH₃), 1.72 (m,2H, CH₂), 1.65 (m, 4H, 2xCH₂).
 Impacto electrónico MS m/z 512 [M⁺].

Ejemplo 27

20 (3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 4- benzoil- 5- (5- metoxi- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d6)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- vinilo), 7.79 (m, 2H), 6.66 (m, 1H), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.43- 2.48 (m,
 25 6H, 3xCH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃), 1.71(m, 2H, CH₂), 1.66 (m, 4H, 2xCH₂).
 Impacto electrónico MS m/z 512 [M⁺].

Ejemplo 28

30 (3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 4- benzoil- 5- (5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

23

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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- vinilo), 7.08 (m, 1H), 7.01 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.42- 2.48 (m, 6H, 3xCH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.65 (m, 4H, 2xCH₂).

5 Impacto electrónico MS *m/z* 500 [M⁺].

Ejemplo 29

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

10 5- bromo- 1,3- dihidro- indol- 2- ona fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 4- acetil- 5- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico (preparado a partir de éster etílico del ácido 4- acetil- 5- formil- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico mediante el método B luego C) para proporcionar el compuesto del título.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 14.19 (s, 1H, NH), 11.19 (br s, 1H, NH), 8.15 (m, 1H, CONHCH₂), 8.11 (s, 1H, H- vinilo), 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, 9H, CH₃ & 3xCH₂), 1.64 (m, 2H, CH₂), 0.93 (t, J=7.1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Ejemplo 30

20 (3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 4- acetil- 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 8.14 (m, 1H, CONHCH₂), 8.10 (s, 1H, H- vinilo), 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, CH₂), 1.65- 1.71 (m, 6H, 3xCH₂)

MS *m/z* 499 & 501 [M⁺2].

Ejemplo 31

30 (3- morfolin- 4- ilpropil) amida del ácido 4- acetil- 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 3- metil- 1H- pirrol- 2- carboxílico

222

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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 & 8.3 Hz, 1H, H- 6), 6.87 (d, J= 8.3 Hz, 1H, H- 7), 3.55 (m, 4H, 2xCH₂), 3.26 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.35 (m, 6H, 3xCH₃), 1.68 (m, 2H, CH₂).

5 MS- EI *m/z* 514 & 516 [M⁺- 1] & [M⁺1].

Ejemplo 32

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

10 ¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 14.17 (s, 1H, CONHCH₂), 11.25 (br s, 1H, HN), 8.10 (s, 1H, H- vinilo), 8.03 (m, 1H, CONHCH₂), 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, CH₂), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂).

MS *m/z* 445 & 447 [M⁺- 1] & [M⁺+1]

15

Ejemplo 34

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

20 ¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 14.19 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, HN), 8.10 (s, 1H, H- vinilo), 7.84 (m, 1H, CONHCH₂), 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, 2xCH₂), 3.40 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.45 (m, CH₃ & CH₂).

MS *m/z* 500 & 502 [M⁺- 1] & [M⁺+1]

25 Ejemplo 35

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 14.17 (s, 1H, NH), 11.23 (s, 1H, HN), 8.11 (s, 1H, H- vinilo), 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

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

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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, 10 3H, CH₃CO), 2.73 (s, 3H, CH₃)

MS *m/z* 507 & 509 [M⁺- 1] & [M⁺+1]

Ejemplo 37

- 15 (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Una mezcla de hidrocloreuro de 2- aminoacetofenona (1 equiv.), isobutirilacetato de etilo (1.2 equiv.) y acetato de sodio (2.4 equiv.) en H₂O fue agitada a 100° C durante 18 horas y luego enfriada a temperatura ambiente. La capa acuosa fue decantada y el aceite fue disuelto en acetato de etilo. Esta fue luego lavada con agua y salmuera y luego secada para proporcionar (93%) de éster etílico del ácido 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- 20 carboxílico como un aceite rojo café.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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).

25 MS- EI *m/z* 257 [M⁺].

La pirrol anterior fue formilada utilizando el método A para proporcionar (41%) de éster etílico del ácido 5- formil- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico como un sólido rojizo.

294

^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^+].

- 5 El éster del ácido pirrolcarboxílico fue hidrolizado utilizando el método B para proporcionar (57%) del ácido 5- formil- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico como un sólido de color amarillento.

^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, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

10

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

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (120 mg, 0.31 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (preparado mediante el método C) para proporcionar 120 mg (71%) del compuesto del título.

15

^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- vinilo), 7.26 (dd, J = 1.8 & 7.8 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.36 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 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 =

20

Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)
MS m/z 565 [M^+].

Ejemplo 38

(3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

25

El ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (127 mg, 0.28 mmol) fue condensado con 3- pirrolidin- 1- il- propilamina (43 mg, 0.336 mmol) para proporcionar 140 mg (66%) del compuesto del título.

228

¹H NMR (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).

5 MS- EI *m/z* 257 [M⁺].

Ejemplo 39

(2- dietilaminoetil)) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

10 5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (57 g, 0.27 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (120 mg) para proporcionar 78 mg (53%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 14.23 (s, br, 1H, NH), 11.09 (s, 1H, NH), 7.38- 7.51 (m, 6H), 7.25- 7.28 (m, 2H), 7.19 (t, 1H, COHCH₂), 6.85 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 3.43 (m, 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

20 [3- (4- metilpiperazin- 1- il) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (53 g, 0.25 mmol) fue condensado con [3- (4- metilpiperazin- 1- il) propil] amida del ácido 5- formil- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (120 mg) para proporcionar 65 mg del compuesto del título.

25 ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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].

30

Ejemplo 41

Ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5 5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (170 mg, 8 mmol) fue condensado con el ácido 5- formil- 2- isopropil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (205 mg) utilizando el método D para proporcionar 210 mg (58%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 14.31 (s, br, 1H, NH), 11.16 (s, br, 1H, NH), 7.26- 7.44 (m, 7H), 7.11 (s, 1H, H- vinilo), 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).

10 MS- EI m/z 542 [M⁺+1].

Ejemplo 42

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

15 5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (44 mg, 0.21 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (70 mg, preparado en la misma forma que el análogo de isopropilo, anterior) para proporcionar 0.03 g (27%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 14.87 (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- vinilo), 7.09 (m, 1H, CONHCH₂), 6.83 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 3.71 (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- iletil) amida del ácido 5- [6- (2- metoxifenil)- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

6- (2- metoxifenil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (50 mg, 0.21 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3-

229

carboxílico (70 mg) para proporcionar 0.04 g (35%) del compuesto del título como un sólido amarillo- anaranjado.

¹H NMR (300 MHz,DMSO- d₆)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- vinilo), 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

10 (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (46 mg, 0.22 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (65 mg) para proporcionar 60 mg g (55%) del compuesto del título como un sólido
15 amarillo.

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d₆)δ 13.36 (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, H- vinilo), 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).
20 MS- EI m/z 494.8 [M⁺ y M⁺+2].

Ejemplo 45

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

25 6- (2- metoxifenil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (53 mg, 0.22 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (65 mg) para proporcionar 0.05 g (44%) del compuesto del título como una goma anaranjada.

¹H NMR (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),
30

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].

5 Ejemplo 46

Éster etílico del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (60 mg, 0.29 mmol) fue condensado con éster etílico del ácido 5- formil- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (75 mg) para
10 proporcionar 78 mg (60%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H-NMR (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 (m, 2H), 7.03 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.15 (dd, J=2.2 & 8.3 Hz, 1H), 3.99- 4.03 (m, 2H, OCH₂CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 0.98- 1.03 (m, 3H, OCH₂CH₃)

15 MS- EI m/z 450 [M⁺- 1 y M⁺+1].

Ejemplo 47

(3- dimetilaminopropil) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

20 5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.47 g, 2.2 mmol) fue condensado con (3- dimetilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 2- metil- 4- fenil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.75 g) para proporcionar 0.11 g (42%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H NMR (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 m/z 535.0 y 573 [M⁺ y M⁺+2].

30 Ejemplo 48

271

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

Una mezcla de 3- oxobutirato tert- butílico y nitrato de sodio (1.equiv.) en ácido acético fue agitada a temperatura ambiente para proporcionar tert- butil- 2- hidroximino- 3- oxobutirato.

Etil- 3- oxobutirato (1 equiv.), polvo de zinc (3.8 equiv.) y tert- butil- 2- hidroximo- 3- oxobutirato crudo en ácido acético fueron agitados a 60° C durante 1 hr. La mezcla de reacción fue vertida en H₂O y el filtrado fue recolectado para proporcionar (65%) 2- tert- butiloxycarbonil- 3,5- dimetil- 4- etoxycarbonilpirrol.

Una mezcla de 2- tert- butiloxycarbonil- 3,5- dimetil- 4- etoxycarbonilpirrol y ortoformato de trietilo (1.5 equiv.) en ácido trifluoroacético fue agitada a 15° C durante 1 hora. La reacción fue concentrada y el residuo fue purificado para proporcionar (64%) 2,4- dimetil- 3- etoxycarbonil- 5- formilpirrol como agujas amarillas.

2,4- dimetil- 3- etoxycarbonil- 5- formilpirrol fue hidrolizada utilizando el método B para proporcionar (90%) de ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico.

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d₆)δ 12 (br, s, 2H, NH y CO₂H),9.58 (s, 1H, CHO), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃).

MS m/z 267 [M⁺].

5- bromo- 1,3- dihidroindol - 2- ona (0.17 g, 0.8 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.2, preparado mediante el método C) utilizando el método B para proporcionar 0.3 g (83%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d₆)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- vinilo), 7.44 (t, J=5.2 Hz, 1H, CONHCH₂), 7.24 (dd, J= 1.8 & 8.4 Hz, 1H, H- 6), 6.82 (d, J=8.4 Hz, 1H, H- 7), 3.26- 3.33 (m, 2H, NCH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, J=6.7 Hz, 2H, NCH₂), 2.18 (s, 6H, N(CH₃)₂). MS- EI m/z 430 y 432 [M⁺- 1 y M⁺+1].

Ejemplo 49

280

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

5- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.17 g, 0.8 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.2 g) para proporcionar 0.13 g (36%) del compuesto del título como un sólido amarillo- naranja

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.59 (s, br, 1H, NH), 10.93 (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- 7.36 (m, 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, NCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, J=6.8 Hz, 2H, NCH₂), 2.18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS- EI m/z 428 [M⁺].

Ejemplo 50

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

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

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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- vinilo), 7.50 (t, J=5.5 Hz, 1H, CONHCH₂), 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, NCH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.36 (t, J=6.6 Hz, 2H, NCH₂), 2.17 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS- EI m/z 386 [M⁺].

Ejemplo 51

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

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.17 g, 0.8 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.2 g) para proporcionar 0.09 g (26%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

^1H NMR (360 MHz, 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- vinilo), 7.42 (t, $J=5.5$ Hz, 1H, CONHCH₂), 7.24 (dd, $J=1.7$ & 8.0 Hz, 1H, H- 6), 6.82 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H- 7), 3.23- 3.32 (m, 2H, NCH₂), 2.46- 2.55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 0.96 (t, $J=7.2$ Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

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- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.09 g, 0.4 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.1 g) para proporcionar 0.14 g (81%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo- naranja.

^1H NMR (300 MHz, 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- vinilo), 7.53 (t, $J=5.5$ Hz, 1H, CONHCH₂), 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, NCH₂), 2.54 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, NCH₂), 2.47 (m, bajo DMSO), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.66- 1.69 (m, 4H, 2xCH₂).

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

Ejemplo 53

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

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.09 g, 0.4 mmol) fue condensado con (3- imidazol- 1- ilpropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.1 g) para proporcionar 0.1 g (59%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

^1H NMR (300 MHz, 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- vinilo), 7.71 (t, $J=5.7$ Hz, 1H, CONHCH₂), 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, NCH₂), 3.18 (q, J= 6.7 Hz, 2H, NCH), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.93 (m, 2H, CH₂)

MS- EI m/z 467 y 469 [M⁺- 1 y M⁺+1].

5 Ejemplo 54

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

6- (2- metoxifenil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (30 mg, 0.13 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (30 mg) para proporcionar 0.06 g (100%) del compuesto del título como una goma de color amarillo- naranja.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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- vinilo), 7.46 (t, J=5.5 Hz, 1H, CONHCH₂), 7.28- 7.35 (m, 2H), 6.99- 7.11 (m, 4H), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.27- 3.31 (m, 2H, NCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.37 (m, 2H, NCH₂), 2.18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS- EI m/z 458 [M⁺-].

Ejemplo 55

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

6- (3- metoxifenil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (30 mg, 0.13 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (30 mg) para proporcionar 8 g (14%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo- naranja.

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) 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- vinilo), 7.42 (m, 1H, CONHCH₂), 7.36 (d, J= 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, OCH₃), 3.21- 3.33 (m, 2H, NCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.36- 2.40 (m, 2H, NCH₂), 2.18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

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

Ejemplo 56

(2- dimetilaminoetil) amida del ácido 2,4- dimetil- 5- (2- oxo- 5- fenil- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (80 g, 0.4 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.1 g) utilizando el método B para proporcionar 79 mg (46%) del compuesto del título.

^1H NMR (300 MHz, 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- vinilo), 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^+].

15 Ejemplo 57

(2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 2,4- dimetil- 5- (2- oxo- 5- fenil- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.04 g, 0.2 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.04 g) para proporcionar 79 mg (46%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo- naranja.

^1H NMR (300 MHz, 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- vinilo), 7.71 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 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), 4.08 (m, 4H, $2\times\text{NCH}_2$), 3.32 (m, 2H, NCH_2), 2.55 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, NCH_2), 2.47 (m, bajo DMSO), 2.43 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1.66 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

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- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (8 g, 0.04 mmol) fue condensado con (3- imidazol- 1- ilpropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (10 mg) para proporcionar 10 mg (59%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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- vinilo), 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, CONCH₂), 2.44 (s, 6H, 2xCH₃), 1.93 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

10 MS- EI m/z 465 [M⁺].

Ejemplo 59

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

15 6- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.08 g, 0.4 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.1 g) para proporcionar 65 mg (38%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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).

20

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- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

6- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (30 g, 0.15 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (40 mg) para proporcionar 5.9 mg (8.5%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo- naranja.

30

28

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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).

5 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- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

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

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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, NCH₂CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.93 (t, J=6.9 Hz, 2H, NCH₂).

15 MS- EI m/z 465 [M⁺].

Ejemplo 62

20 (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- [6- (3,5- diclorofenil)- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico.

6- (3,5- diclorofenil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (64 mg, 0.23 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (60 mg) para proporcionar 53 g (44%) del compuesto del título como un sólido de color café claro.

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) 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, 3xCH₂CH₃).

30 MS- EI m/z 526.9 [M⁺].

Ejemplo 63

(2- dimetilaminoetil) amida del ácido 2,4- dimetil- 5- (2- oxo- 6- piridin- il- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

- 5 6- piridin- 3- il- 1,3- dihidroindol- 2- ona (40 mg, 0.19 mmol) fue condensado con (2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (50 mg) para proporcionar 29 mg (33%) del compuesto del título como un sólido de color naranja claro.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.62 (s, br, 1H, NH), 10.05 (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- vinilo), 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), (s, 3H, CH₃), 0.96 (t, J= 6.9 Hz, 2xNCH₂CH₃). MS- EI m/z 457 [M⁺].

15 **Ejemplo 64**

(2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 2,4- dimetil- 5- (2- oxo- 6- piridin- 3- il- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

- 20 6- piridin- 3- il- dihidroindol- 2- ona (60 g, 0.28 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (75 mg) para proporcionar 90 mg (71%) del compuesto del título como un sólido anaranjado claro.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.05 (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- vinilo), 7.44- 7.53 (m, 2H), 7.36 (dd, J= 1.5 & 8.1 Hz, 1H), 7.15 (d, J= 1.2 Hz, 1H), 7.15 (d, J= 1.2 Hz, 1H), 3.33 (m, 2H, CH₂), 2.47- 2.57 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂). MS- EI m/z 455 [M⁺].

Ejemplo 65

287

(3- dimetilaminopropil) amida del ácido 2,4- dimetil- 5- (2- oxo- 6- piridin- 3- il- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

6- piridin- 3- il- dihidroindol- 2- ona (42 mg, 2.0 mmol) fue condensado con (3- dimetilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (50 mg) para proporcionar 67 mg (75%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo- café.

¹H NMR (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- vinilo), 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- 6- fenil- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

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

¹H NMR (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, 2xNCH₃), 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- 6- fenil- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

286

6- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (1.5 g, 7.16 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (2 g) para proporcionar 1.3 g (40%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo-naranja.

- 5 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) 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), 7.44 (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, CONCH₂), 2.5 (m, 12H, 3xNCH₂ y 2xCH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.93 (t, $J=6.7$ Hz, 6H, NCH₂CH₃).
- 10 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- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

- 15 6- fenil- 1,3- dihidroindol- 2- ona (1.5 g, 7.16 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (2 g) para proporcionar 1.9 g (57%) del compuesto del título como un sólido de color naranja.
- ^1H NMR (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 y 2xCH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.5 (m, 12H, 3xNCH₂ y 2xCH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.93 (t, $J=6.7$ Hz, 6H, NCH₂CH₃).
- 20 MS- EI m/z 470 [M^+].

25 Ejemplo 69

(3- cloro- 4- metoxifenil) amida del ácido 3- [4- (3- dietilaminopropilcarbamoil)- 3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2- ilmetileno]- 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 4- carboxílico.

El ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 4- carboxílico (1g, 3.16 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol-

28d

3- carboxílico (1 g 3.58 mmol) para proporcionar 1.7 g (85%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo- naranja.

MS- EI m/z 578.2 [M^+].

5 Ejemplo 70

(3- dietilamino- propil) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 6- fenil- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.5 g, 2.36 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (0.51 g) para proporcionar 0.84 g del compuesto del título como un sólido de color rojo- anaranjado.

^1H NMR (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 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 3.3 (br, s, 4H, $2 \times \text{NCH}_2$), 3.2 (m, 2H, CONCH_2), 2.6 (br, s, 2H, NCH_2 y $2 \times \text{CH}_3$), 2.4 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.66 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.98 (t, $J=7.1$ Hz, 6H, NCH_2CH_3).

MS- EI m/z 472 [M^+].

Ejemplo 71

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

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (100 mg, 0.47 mmol) fue condensado con (2- dietilamino- etil) amida del ácido 5- formil- 2,4- diisopropil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (150 mg) para proporcionar 0.15 g (62%) del compuesto del título como un sólido amarillo- anaranjado.

^1H NMR (300 MHz, 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, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 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 [$M^+ - 1$ Y $M^+ + 1$].

30

290

Ejemplo 72

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

5 5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (90 mg, 0.42 mmol) fue condensado con (3- dietilaminopropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- diisopropil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (140 mg) para proporcionar 54 g (25%) del compuesto del título como un sólido rojo- café.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.98 (s, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NH), 8.09 (d, J=1.7 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H, H.vinilo), 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, NHCH₂), 3.15 (m, 1H, CH), 2.7 (br, s, 6H, 10 3xCH₂), 1.7 (br, m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.28 (d, J= 6.9 Hz, 6H, 2xCH₂CH₃), 1.06 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

MS- EI m/z 528 Y 530 [M⁺- 1 Y M⁺+1].

Ejemplo 73

15 (3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2,4- diisopropil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (130 g, 0.6 mmol) fue condensado con (3- pirrolidin- 1- ilpropil) amida del ácido 5- formil- 2,4- diisopropil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (150 mg, 0.45 mmol) para proporcionar 36 mg (15%) del compuesto del título como un 20 sólido canela- anaranjado.

¹H NMR (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- vinilo), 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, NHCH), 3.15 (m, 1H, CH), 2.7 (br, s, 6H, 25 3xCH₂), 1.7 (br m, 6H, 3xNCH₂CH₃), 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

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

291

5- bromo- 1,3- dihidroindol- 2- ona (170 g, 0.8 mmol) fue condensado con (piridin- 4- ilmetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (200 mg) para proporcionar 14 mg (4%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

¹H NMR (300 MHz,DMSO- d₆)δ 13.67 (s, 1H, NH),11.01 (s, 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, - vinilo), 7.31 (d, J= 6.0 Hz 2H), 7.25 (dd, J= 1.9 & 8.1 Hz, 1H), 6.82 (d, J=8.1 Hz 1H), 4.45 (d, J= 6.0 Hz, 2H, NCH₂), 2.46 (s, 6H, 2xCH₃).
MS- EI m/z 450 Y 452 [M⁺- 1 Y M⁺+1].

10 Ejemplo 75

(2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- [6- (4- butilfenil)- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- [6- (4- butilfenil)]- 1,3- dihidroindol- 2- ona (50 mg, 0.19 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (50 mg) para proporcionar 74 mg (76%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H NMR (300 MHz,DMSO- d₆)δ 13.58 (s, 1H, NH),10.93 (s, 1H, NH), 7.82 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.63 (s, 1H, H- vinilo), 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, CH₂), 2.52- 2.63 (m, 4H, 2xCH₂), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.68 (m, 4H, 2xCH₂), 1.58 (m, 2H, CH₂), 1.34 (m, 2H, CH₂), 0.91 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃)
MS- EI m/z 510 [M⁺].

Ejemplo 76

25 (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- [6- (5- isopropil- 2- metoxifenil)- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

6- (5- isopropil- 2- metoxifenil)]- 1,3- dihidroindol- 2- ona (50 mg, 0.17 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol-

3- carboxílico (45 mg) para proporcionar 67 mg (75%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.60 (s, 1H, NH), 10.82 (s, 1H, NH), 7.77 (d, J=7.9 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H, H. vinilo), 7.45 (m, 1H, CONH), 7.0- 7.19 (m, 5H), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (m, 2H, CH₂), 2.87 (m, 1H, CH(CH₃)), 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⁺].

10 Ejemplo 77

(2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- [6- (4- etilfenil)- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

6- (4- etilfenil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (45 mg, 0.19 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (50 mg) para proporcionar 60 mg (65%) del compuesto del título como un sólido amarillo-anaranjado.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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. vinilo), 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- iletil) amida del ácido 5- [6- (2,4- dimetoxifenil)- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

6- (2,4- dimetoxifenil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (51 mg, 0.19 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol-

3- carboxílico (50 mg) para proporcionar 30 mg (31%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.59 (s, 1H, NH), 10.86 (s, br, 1H, NH), 7.75 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H, H. vinilo), 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⁺].

10 Ejemplo 79

(2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- [6- (3- isopropilfenil)- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

6- (3- isopropilfenil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (48 mg, 0.19 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3-

15 carboxílico (50 mg) para proporcionar 59 mg (63%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.63 (s, 1H, NH), 10.97 (s, br, 1H, NH), 7.87 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H, H. vinilo), 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- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

25 5- fluoro- 1,3- dihidroindol- 2- ona (0.54 g, 3.8 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico para proporcionar 0.83 mg (55%) del compuesto del título como un sólido de color amarillo-verde.

294

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.66 (s, 1H, NH), 10.83 (s, br, 1H, NH), 7.73 (dd, $J=2.5$ & 9.4 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H, H vinilo), 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).

5 MS- EI m/z 398 [M^+].

Ejemplo 80 (síntesis alternativa)

(2- dietilamino- iletil) amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

10 Hidrato de hidrazina (55%, 3000 mL) y 5- fluoroisatina (300 g) fueron calentados a 100° C. Se agregó 5- fluoro- isatin (500 g) adicional en porciones (100 g) con agitación durante 120 minutos. La mezcla fue calentada a 110 °C y agitada durante 4 horas. La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y los sólidos recolectados mediante filtración al vacío para proporcionar hidrazida del ácido (2- amino- 5- fluoro- fenil)- acético (748 g)

15 crudo. La hidrazida fue suspendida en agua (700 mL) y el pH de la mezcla ajustado a <pH 3 con ácido clorhídrico 12 N. La mezcla fue agitada durante 12 horas a temperatura ambiente. Los sólidos fueron recolectados mediante filtración al vacío y lavados dos veces con agua. El producto fue secado al vacío para proporcionar 5- fluoro- 1,3- dihidro- indol- 2- ona (600 g, rendimiento del 73%) como un polvo café. ^1H -NMR (dimetilsulfoxido- d_6) δ

20 δ 3.46 (s, 2H, CH₂), 6.75, 6.95, 7.05 (3 x m, 3H, aromático), 10.35 (s, 1H, NH). MS m/z 152[M+1].

Éster 2- tert- butílico éster 4- etílico del ácido 3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2,4- dicarboxílico (2600 g) y etanol (7800 mL) fueron agitados vigorosamente mientras se agregó lentamente ácido clorhídrico 10N (3650 mL). La temperatura aumento de 25°C a

25 35°C y comenzó la evolución de gas. La mezcla fue calentada a 54°C y agitada con calentamiento adicional durante una hora tiempo en el cual la temperatura fue de 67°C. La mezcla fue enfriada a 5°C y se agregó lentamente 32 L de hielo y agua con agitación. El sólido fue recolectado mediante filtración al vacío y lavado tres veces con agua. El sólido fue secado al aire hasta peso constante para proporcionar éster etílico del ácido 2,4-dimetil-

30 1H-pirrol-3-carboxílico (1418 g, rendimiento del 87%) como un sólido rosado. ^1H -NMR

(dimetilsulfoxida- d_6) δ 2.10, 2.35 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4.13 (q, 2H, CH₂), 6.37 (s, 1H, CH), 10.85 (s, 1H, NH). MS m/z 167[M+1].

Dimetilformamida (322 g) y diclorometano (3700) fueron enfriados en un baño helado a 4°C y se agregó con agitación oxícloruro de fósforo (684 g). Se agregó lentamente
 5 éster etílico sólido del ácido 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (670 g) en alícuotas durante 15 minutos. La temperatura máxima alcanzada fue 18°C. La mezcla fue calentada hasta reflujo durante una hora, enfriada a 10°C en un baño helado y se agregó rápidamente 1.6 L de agua con agitación vigorosa. La temperatura aumento a 15°C. Se agregó ácido clorhídrico 10N (1.6 L) con agitación vigorosa. La temperatura aumento a 22°C. La mezcla
 10 se dejo reposar durante 30 minutos y las capas se dejaron separar. La temperatura alcanzo un máximo de 40°C. La capa acuosa fue ajustada a pH 12-13 con hidróxido de potasio 10 N (3.8 L) a una tasa que permitió que la temperatura alcanzara y permaneciera en 55°C durante la adición. Después de terminar la adición la mezcla fue enfriada a 10°C y agitada durante 1 hora. El sólido fue recolectado mediante filtración al vacío y lavado cuatro veces
 15 con agua para proporcionar éster etílico del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (778 g, rendimiento de 100%) como un sólido amarillo. ¹H-NMR (DMSO- d_6) δ 1.25, (t, 3H, CH₃), 2.44, 2.48 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4.16 (q, 2H, CH₂), 9.59 (s, 1H, CHO), 12.15 (br s, 1H, NH). MS m/z 195[M+1].

Éster etílico del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (806 g),
 20 hidróxido de potasio (548 g), agua (2400 mL) y metanol (300 mL) fueron sometidos a reflujo durante dos horas con agitación y luego enfriados a 8°C. La mezcla fue extraída dos veces con diclorometano. La capa acuosa fue ajustada a pH 4 con 1000 mL de ácido clorhídrico manteniendo la temperatura por debajo de 15°C. Se agregó agua para facilitar la agitación. El sólido fue recolectado mediante filtración al vacío, lavados tres veces y secado
 25 al vacío a 50°C para proporcionar el ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (645 g, 93.5% de rendimiento) como un sólido amarillo. NMR (DMSO- d_6) δ 2.40, 2.43 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 9.57 (s, 1H, CHO), 12.07 (br s, 2H, NH+COOH). MS m/z 168[M+1].

Acido 5- formil- 2,4- 1H- pirrol- 3- carboxílico (1204 g) y 6020 mL de dimetilformamida fueron agitados a temperatura ambiente mientras se agregó hidrocloreuro
 30 de 1-(3-dimetil-aminopropil-3-etilcarbodiimida (2071 g), hidroxibenzotriazol (1460 g),

trietilamina (2016 mL) y dietiletilendiamina (1215 mL). La mezcla fue agitada durante 20 horas a temperatura ambiente. La mezcla fue diluida con 3000 mL de agua, 2000 mL de salmuera y 3000 mL de solución de bicarbonato de sodio saturado y el pH ajustado a más de 10 con hidróxido de sodio 10N. La mezcla fue extraída dos veces con 5000 mL cada vez de metanol al 10% en diclorometano y los extractos combinados, secados sobre sulfato de magnesio anhidro y evaporado hasta sequedad. El residuo fue triturado con 3:1 hexano: éter de dietilo (4000 mL). Los sólidos fueron recolectados mediante filtración al vacío, lavados dos veces con 400 mL de acetato de etilo y secados al vacío a 34°C durante 21 horas para proporcionar (2- dietilamino- etil)- amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (819 g, rendimiento del 43%) como un sólido café claro. ¹H-NMR (dimetilsulfoxida-d₆) δ 0.96, (t, 6H, 2xCH₃), 2.31, 2.38 (2xs, 2xCH₃), 2.51 (m, 6H, 3xCH₂), 3.28 (m, 2H, CH₂), 7.34 (m, 1H, amida NH), 9.56 (s, 1H, CHO), 11.86 (s, 1H, pirrol HN) MS *m/z* 266[M+1].

(2- dietilaminoetil)- amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (809 g), 5- fluoro- 1,3- dihidro- indol- 2- ona (438 g), etanol (8000 mL) y pirrolidina (13 mL) fueron calentados a 78°C durante 3 horas. La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y los sólidos fueron recolectados mediante filtración al vacío y lavados con etanol. Los sólidos fueron agitados con etanol (5900 mL) a 72° durante 30 minutos. La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente. Los sólidos fueron recolectados mediante filtración al vacío, lavados con etanol y secados al vacío a 54°C durante 130 horas para proporcionar (2- dietilamino- etil)- amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (2-dietilamino- etil)- amida (1013 g, rendimiento del 88%) como un sólido naranja. ¹H-NMR (dimetilsulfoxida-d₆) δ 0.98, (t, 6H, 2xCH₃), 2.43, 2.44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 6H, 3xCH₂), 3.28 (q, 2H, CH₂), 6.84, 6.92, 7.42, 7.71, 7.50 (5xm, 5H, aromático, vinilo, CONH), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.68 (s, 1H, pirrol HN) MS *m/z* 397 [M+1].

Ejemplo 81

Acido 3- [4- (2- dietilaminoetilcarbamoil)- 3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2- ilmetileno]- 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 6- carboxílico

297

El ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 6- carboxílico (80 mg, 0.45 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo- anaranjado.

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d₆)δ 13.6 (s, 1H, NH),7.76 (d, J= 8.0, Hz, 1H), 7.66 (s, 1H, H vinilo), 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- piperidina), 2.54 (m, 6H, 3xCH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.56 (m, H- piperidina), 0.97 (t, J=6.98 Hz, N(CH₂CH₃)₂).
MS m/z 424 [M⁺].

10 Ejemplo 82

(2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- (5- dimetilsulfamoil- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

dimetilamida del ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 5- sulfónico (90 mg, 0.38 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (100 mg) para proporcionar 100 mg (54%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d₆)δ 13.6 (s, 1H, NH),11.30 (s, br, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, H- vinilo), 7.48- 7.53 (m, 2H), 7.07 (d, J= 8.2 Hz, 1H), 3.33 (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 m/z 485 [M⁺].

Ejemplo 83

(2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- [5- (3- clorofenilsulfamoil)- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

(3- cloro- fenil)amida del ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 5- sulfónico (120 mg, 0.38 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (100 mg) para proporcionar 150 mg (69%) del compuesto del título como un sólido amarillo anaranjado.

296

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.55 (s, 1H, NH), 11.26 (br, s, 1H, NH), 10.30 (br, 1H, NH), 8.26 (d, 1H), 7.79 (s, 1H, H. vinilo), 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).

5 MS- EI m/z 568 [M⁺].

Ejemplo 84

(2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 2,4- dimetil- 5- [2- oxo- 5- (piridin- 3- ilsulfamoil)- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil]- 1H- pirrol- 3- carboxílico

10 piridin- 3- ilamida del ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 5- sulfónico (110 mg, 0.38 mmol) fue condensado con (2- pirrolidin- 1- iletil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (100 mg) para proporcionar 150 mg (74%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

15 ¹H NMR (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. vinilo), 7.49- 7.54 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 6.94 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 3.33 (m, 2H, CH₂), 2.56 (t, J= 7.06 Hz, 2H, CH₂), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.43 (s, 6H, 2xCH₃), 1.68 (m, 4H, 2xCH₂).

MS m/z 535 [M⁺].

20 Ejemplo 85

3- [3,5- dimetil- 4- (4- metilpiperazina- 1- carbonil)- 1H- pirrol- 2- ilmetileno]- 4- (2- hidroxietil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona.

25 4- (2- hidroxietil)- 1,3- dihidroindol- 2- ona (71 mg, 0.4 mmol) fue condensado con 3,5- dimetil- 4- (4- metil- piperazina- 1- carbonil)- 1H- pirrol- 2- carbaldehído para proporcionar 90 mg (55%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 14.25 (s, 1H, NH), 10.88 (s, 1H, NH), 7.57 (s, 1H, H. vinilo), 7.03 (m, 1H), 6.75- 6.82 (m, 2H), 4.86 (m, 1H, OH), 3.70 (m, 2H, CH₂), 3.04 (m, 2H, CH₂), 2.45 (m, 4H, 2xCH₂), 2.28 (br, s, 7H), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃).

MS m/z (+ve) 409.3 [M⁺].

Ejemplo 86

Fenilamida del ácido 3- [3,5- dimetil- 4- (4- metilpiperazina- 1- carbonil)- 1H- pirrol- 2- ilmetileno]- 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- 5- sulfónico

- 5 Fenilamida del ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 5- sulfónico (110 mg, 0.4 mmol) fue condensado con 3,5- dimetilpiperazina- 1- carbonil)- 1H- pirrol- 2- carbaldehído (100 mg) para proporcionar 50 mg (24%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) 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 vinilo), 7.50 (dd, J = 1.6 & 8.3 Hz, 1H),
 10 7.19(m, 2H), 7.10 (m, 2H), 6.97 (m, 2H), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.28 (m, 10H, 2xCH₃ & 2xCH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃).
 MS- EI m/z 519 [M⁺].

Ejemplo 87

- 15 (2- dietilaminoetil) amida del ácido 5- (5- dimetilsulfamoil- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Dimetilamida del ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 5- sulfónico (90 mg, 0.38 mmol) fue condensada con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (100 mg) para proporcionar 80 mg (43%) del compuesto del título
 20 como un sólido amarillo.

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 11.30 (s, 1H, NH), 8.27 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H, H- vinilo), 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), 0.96 (t, J = 7.2, Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).
 25 MS- EI m/z 487 [M⁺].

Ejemplo 88

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

300

(3- cloro- fenil) amida del ácido 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 5- sulfónico (120 mg, 3.8 mmol) fue condensado con (2- dietilaminoetil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (100 mg) para proporcionar 80 mg (37%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

5 ¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.55 (s, 1H, NH), 11.24 (s, 1H, HN), 10.29 (s, 1H, NH), 8.25 (d, J= 1.87 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H, H. vinilo), 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 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, J= 7.0 Hz, 6H, (CH₂CH₃)₂)

10 MS- EI m/z 570
[M⁺].

Ejemplo 95

Éster etílico del ácido 3- (2- oxo- 5- fenil- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 4,5,6,7-

15 tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.74 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, HN), 8.13 (d, J= 1.7 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H. vinilo), 7.70 (d, J=7.77 Hz, 2H), 7.49 (dd, J= 1.7 & 8.0 Hz, 1H), 7.44 (t, J=7.7 Hz, 2H), 7.32 (m, 1H), 6.96 (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), 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

25 Éster etílico del ácido 3- (2- oxo- 5- fenilsulfamoyl- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- carboxílico

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.64 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, HN), 10.07 (s, 1H, NH), 8.24 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H. vinilo), 7.57 (dd, J=1.8 & 8.0 Hz, 1H), 7.21

301

(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⁺].

5

Ejemplo 109

Acido 3- [3- (morfolina- 4- carbonil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- ilmetileno]- 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 6- carboxflico

¹H NMR (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. vinilo), 7.62 (dd, J=1.4 & 7.8 Hz, 1H), 7.41 (d, J= 1.4 Hz, 2H), 3.65 (m, 4H, 2xCH₂), 3.55 (m, 4H, 2xCH₂), 2.81 (m, 2H, CH₂), 2.54 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂).

MS- EI m/z 421 [M⁺].

15 Ejemplo 112

5- bromo- 3- [3- (pirrolidina- 1- carbonil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- ilmetileno]- 1,3- dihidro- indol- 2- ona

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d₆)δ 13.56 (s, 1H, NH),11.00 (s, 1H, HN), 8.05 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H. vinilo), 7.28 (dd, J=1.3& 8.3 Hz, 1H), 6.83 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 3.57 (m, 4H, 2xCH₂), 2.79 (m, 2H, CH₂), 2.65 (m, 2H, CH₂), 1.88 (m, 4H, 2xCH₂), 1.71 (m, 4H, 2xCH₂).

MS- EI m/z 439 & 441 [M⁺- 1] & [M⁺+1].

Ejemplo 114

25 Acido 3- (3- dimetilcarbamoil- 4,5,6,7- tetrahidro- 2H- isoindol- 1- ilmetileno)- 2- oxo- 2,3- dihidro- 1H- indol- 6- carboxflico

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d₆)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. vinilo), 7.62 (dd, J=1.3& 7.9 Hz,

302

1H), 7.42 (d, J= 1.3 Hz, 1H), 3.03 (s, J=7.6 Hz, 2H), 6.99 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.98 (d, J= 6H, N(CH₃)₂), 2.81 (m, 2H, CH₂), 2.55 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂).

MS- EI m/z 379 [M⁺].

5 Ejemplo 115

Acido 4- metil- 5- (5- metilsulfamoil- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.56 (br, s, 1H, NH), 8.24 (d, J= 1.5 HZ, 1H), 7.86 (s, 1H, H. vinilo), 7.74 (d, J=2.96 Hz, 1H), 7.56 (dd, J= 1.5 & 8.1 Hz, 1H), 7.20 (br m, 10 1H, NHCH₃), 7.03 (d, J=8.1 Hz, 1H), 2.57 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃).

MS- EI m/z 361 [M⁺].

Ejemplo 116

Éster etílico del ácido {[4- metil- 5- (4- metil- 5- metilsulfamoil- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carbonil]- amino}- acético

15 Éster etílico del ácido 4- metil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (lit. ref. D. O. Cheng, T. L. Bowman y E. LeGoff; J. Heterocyclic Chem; 1976; 13; 1145- 1147) fue formulado utilizando el método A, hidrolizado utilizando el método B seguido por amidación (método C) para proporcionar éster etílico del ácido [(5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 3- carbonil)- amino]- 20 amino]- acético.

4- metil- 5- metilaminosulfonil- 2- oxindol (5 mg, 0.21 mmol) fue condensado con éster etílico del ácido [(5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 3- carbonil)- amino]- acético (100 mg, 0.42 mmol) y piperidina (0.1 mL) en etanol (2 mL) para proporcionar 50 mg (52%) del compuesto del título.

25 ¹H NMR (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. vinilo), 7.71 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.34 (br m, 1H, NHCH₃), 6.89 (d, J=8.5 Hz, 2H), 4.11 (q, J= 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.92 (d, J= 5.8 Hz, 2H, GlyCH₂), 2.86 (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).

303

MS- EI m/z 460 [M⁺].

Ejemplo 117

Éster etílico del ácido {[4- metil- 5- (5- metilsulfamoyl- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carbonil]- amino}- acético

Una mezcla de 5- metilaminosulfonil- 2- oxidol (0.06 g, 0.22 mmol), éster etílico del ácido[(5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 3- carbonil)- amino] (0.075 g, 0.27 mmol) y piperidina (2 gotas) en etanol (5 mL) fue calentada en un tubo sellado a 90°C durante 12 hrs. Después de enfriar, el precipitado fue recolectado mediante filtración al vacío, lavado con etanol, triturado con diclorometano/éter y secado para proporcionar 0.035 g (36%) del compuesto del título como un sólido amarillo - café.

¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) 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. vinilo), 7.84 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.57 (dd, J= 1.9 & 8.5 Hz, 1H), 7.14 (br m, 1H, NHCH₃), 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, NCH₃), 1.20 (t, J= 6.7 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS m/z 446 [M⁺].

Ejemplo 118

Acido {[4- metil- 5- (5- metilsulfamoyl- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carbonil]- amino}- acético

Una mezcla de éster etílico del ácido[(5- formil- 4- metil- 1H- pirrol- 3- carbonil)- amino]- acético (0.142 g, 0.59 mmol) y 1N NaOH (1.2 mL) en metanol (10 mL) fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hr. La reacción fue concentrada y el residuo fue condensado con 5- metilaminosulfonil- 2- oxindol (0.13 g, 0.48 mmol) y piperidina (0.12 mL) en etanol para proporcionar 0.11 g (52%) del compuesto del título.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.98 (br s, 1H, NH), 8.17 (s, 1H), 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),

304

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⁺].

5 Ejemplo 120

Acido 5- metil- 2- (2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

¹H NMR (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- vinilo), 7.43 (d, J=.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⁺].

Ejemplo 121

Éster etílico del ácido 5- metil- 2- (2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

¹H NMR (300 MHz,DMSO- d₆)δ 13.79 (s, 1H, NH), 11.08 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H- vinilo), 7.45 (d, J=7.52 Hz, 1H), 7.20 (t, J= 7.25 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), 4.26 (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 [M⁺].

Ejemplo 122

Éster etílico del ácido 2- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol)- 3- ilidenmetil)- 5- metil- 1H- pirrol- 3- carboxílico.

¹H NMR (360 MHz,DMSO- d₆)δ 13.72 (s, 1H, NH), 11.16 (s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, H- vinilo), 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)

305

MS m/z 347 & 377 [M⁺+H].

Ejemplo 123

Ácido 2- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 5- metil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.72 (s, 1H, NH), 12.57 (s, 1H, COOH), 11.19 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H- vinilo), 7.51 (d, J= 1.4 Hz, 1H), 7.34 (dd, J=1.4 & 8.1 Hz, 1H), 6.87 (t, J= 8.17 Hz, 1H) 6.52 (d, J=2.5 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H, CH₃).

MS m/z 347 & 349 [M+H]⁺.

Ejemplo 124

(2- pirrolidin- 1- iletil)- amida del ácido 2- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 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 agregó 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 agitar a temperatura ambiente durante la noche, la reacción fue diluida con bicarbonato de sodio saturado y salmuera (con sal extra) y extraída con metanol al 10% en diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera, secadas sobre sulfato de sodio anhidro y concentradas para proporcionar 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 piperidina (0.2 mL) en etanol (2 mL) fue calentada en un tubo sellado a 80°C durante 1 hr y luego enfriada. El precipitado formado fue recolectado mediante filtración al vacío, lavada con etanol y acetato de etilo y secada para proporcionar el compuesto del título como un sólido anaranjado.

206

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 13.62 (s, 1H, NH), 11.06 (br s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, H- vinilo), 8.15 (m, 1H, CONHCH₂), 7.48 (d, J= 1.8 Hz, 1H), 7.31 (dd, J=1.8 & 7.9 Hz, 1H), 6.86 (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).

5 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- ilidenmetil)- 5- metil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

10 A una solución de ácido 2- formil- 5- metil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (320 mg, 2.1 mmol) en dimetilformamida (3 mL) se agregó 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- dietiletilendiamina (0.32 mL, 1.1 equiv.). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la reacción fue diluida con bicarbonato de sodio
15 saturado y salmuera (con sal extra) y extraída con metanol al 10% en diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera, secadas sobre sulfato de sodio anhidro y concentradas para proporcionar (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)-
20 amida del ácido 2- formil- 5- metil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (126 mg, 1 equiv.) y piperidina (0.2 mL) en etanol (2 mL) fue calentada en un tubo sellado a 80°C durante 1 hr y luego enfriada. El precipitado fue recolectado mediante filtración al vacío, lavada con etanol y acetato de etilo y secada para proporcionar el compuesto del título como un sólido anaranjado.

25 ¹H NMR (360 MHz, DMSO- d₆) δ 13.62 (s, 1H, NH), 11.11 (br s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, H- vinilo), 8.1 (m, 1H, CONHCH₂), 7.49 (d, J= 2.2 Hz, 1H), 7.31 (dd, J=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, HNCH₂CH₂), 2.59 (m, 6H, 3xCH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 0.99 (t, J=6.8 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 445/447 [M⁺ y M⁺+2].

307

Ejemplo 126**(2- dietilamino- etil)- amida del ácido 2,4- dimetil- 5- (2- oxo- 1,2- dihidroindol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico**

5 A 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 piperidina (1 gota) en etanol se calentó a 90°C durante 2 horas. La reacción fue enfriada a temperatura ambiente, el precipitado resultante fue recolectado mediante filtración al vacío, lavado con etanol y secado para proporcionar 422 mg (55%) del compuesto del título como
10 un sólido amarillo claro.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 13.7 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, NH), 7.88 (d, J= 7.6 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H, H- vinilo), 7.41 (t, J= 5.4 Hz, 1H, NH), 7.13 (dt, J= 2.2 Hz, 1H), 7.31 (dd, J= 2.2 & 8.3 Hz, 1H), 6.99 (dt, J= 1.2 & 7.6 Hz, 1H), 6.88 (d, J= 7.76 Hz, 1H), 3.28 (m, 2H), 2.48-2.55 (m, 6H), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, J= 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).
15 MS + ve APCI 381 [M⁺+1].

Ejemplo 127**(2- dietilamino- etil)- amida del ácido 5- (5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico**

20 A 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 fue enfriada a temperatura ambiente, el precipitado resultante fue recolectado mediante
25 filtración al vacío, lavado con etanol y secado para proporcionar 565 mg (68%) del compuesto del título como un sólido anaranjado.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 13.65 (s, 1H, NH), 11.0 (s, 1H, NH), 7.98 (d, J= 2.1 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H, H- vinilo), 7.44 (t, NH), 7.13 (dd, J= 2.1 & 8.4 Hz, 1H, NH), 6.87

298

(d, J= 8.4 Hz, 1H), 3.28 (g, 2H), 2.48-2.53 (m, 6H) 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, J= 7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS + ve APCI 415 [M⁺+1].

5 Ejemplo 128

(2- pirrolidin- 1- etil) amida del ácido 2,4- dimetil- 5- (2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

1,3- dihidro- indol- 2- ona fue condensado con (2- pirrolidin- 1- il- etil)- amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico para proporcionar el compuesto del

10 título.

MS + ve APCI 379 [M⁺ + 1].

Ejemplo 129

(2- pirrolidin- 1- il- etil) amida del ácido 5- (5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

15

5- fluoro- 1,3- dihidro- indol- 2- ona fue condensado con (2- pirrolidin- 1- il- etil)- amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico para proporcionar el compuesto del título.

MS + ve APCI 379 [M⁺ + 1].

20 Procedimiento de Escalamiento

Acido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (61 g), 5- fluoro- 1,3- dihidro- indol- 2- ona (79 g), etanol (300 mL) y pirrolidina (32 mL) fueron sometidos a reflujo durante 4.5 horas. Se agregó ácido acético (24 mL) a la mezcla y el reflujo continuo durante 30 minutos. La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y los sólidos

25 recolectados mediante filtración al vacío y lavados dos veces con etanol. Los sólidos fueron agitados durante 130 minutos en acetona al 40% en agua (400 mL) conteniendo ácido clorhídrico 12 N (6.5 mL). Los sólidos fueron recolectados mediante filtración al vacío y lavados dos veces con acetona al 40% en agua. Los sólidos fueron secados al vacío para proporcionar el ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- 30 dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (86 g, rendimiento 79%) como un sólido anaranjado.

291

¹H- NMR (dimetilsulfoxido- d6) δ 2.48, 2.50 (2Xs, 6H, 2xCH3), 6.80, 6.88, 7.68, 7.72 (4xm, 4H, aromático y vinilo), 10.88 (s, 1H, CONH), 12.12 (s, 1H, COOH), 13.82 (s, 1H, pirrol NH). Ms *m/z* 299 [M- 1].

5 Acido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (100 g) y dimetilformamida (500 mL) fueron agitados y hexafluorofosfato de benzotriazol- 1- iloxitris (dimetilamino)fosfonio (221 g), 1- (2- aminoetil)pirrolidina (45.6 g) y se agrego trietilamina (93 mL). La mezcla fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto sólido fue recolectado mediante filtración al vacío y lavado con etanol. Los sólidos fueron lavados en pasta aguada
10 mediante agitación con etanol (500 mL) durante 1 hora a 64 °C y enfriados a temperatura ambiente. Los sólidos fueron recolectados mediante filtración al vacío, lavados con etanol, y secados al vacío para proporcionar (2- pirrolidin- 1- il- etil)- amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (101.5 g, rendimiento 77%). ¹H- NMR (dimetilsulfoxido- d6) δ 1.60 (m, 4H, 2xCH2) 2.40, 2.44 (2Xs, 6H, 2xCH3), 2.50 (m, 4H, 2xCH2), 2.57, 3.35, (2xm, 4H, 2XCH2), 7.53, 7.70, 7.73, 7.76 (4xm, 4H aromático y vinilo), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.67 (s, 1H, pirrol NH). Ms *m/z* 396 [M+1].
15

Ejemplo 130

20 (2- pirrolidin- 1- il- etil) amida del ácido 5- (5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- cloro- 1,3- dihidro- indol- 2- ona fue condensado con (2- pirrolidin- 1- il- etil)- amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico para proporcionar el compuesto del título.

25 MS + ve APCI 413 [M⁺ + 1].

Ejemplo 131

(2- dimetilaminoetil) amida del ácido 2,4- dimetil- 5- (2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 1H- pirrol- 3- carboxílico

1,3- dihidro- indol- 2- ona fue condensado con (2- dimetilamino- etil)- amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico para proporcionar el compuesto del título.

¹H NMR (400 MHz,DMSO- d₆)δ 13.63 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH), 7.88 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H, H- vinilo), 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, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, J= 6.6 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂)
MS + ve APCI 353 [M⁺+1].

10 Ejemplo 132

(2- dimetilaminoetil) amida del ácido 5- (5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- fluoro- 1,3- dihidro- indol- 2- ona fue condensado con (2- dimetilaminoetil)- amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico para proporcionar el
15 compuesto del título.

¹H NMR (400 MHz,DMSO- d₆)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- vinilo), 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, 1H) 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, J=6.6 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂).
20 MS + ve APCI 371 [M⁺+1].

Ejemplo 193

(2- etilamino- etil) amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

25 (2- etilamino- etil)- amida del ácido 5- formil- 2- oxo- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (99 g), etanol (400 mL), 5- fluoro- 2- oxidol (32 g) y pirrolidina (1.5 g) fueron sometidos a reflujo durante 3 horas con agitación. La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y los sólidos recolectados mediante filtración al vacío. Los sólidos fueron agitados en etanol a 60 °C, enfriados a temperatura ambiente y recolectados mediante

311

filtración al vacío. El producto fue secado al vacío para proporcionar (2- etilamino- etil)- amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (75 g, rendimiento 95%). ¹H_ NMR (dimetilsulfoxida-d₆) δ 1.03 (t, 3H, CH₃), 2.42, 2.44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 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 195

(2- dietilamino- N- oxoamino- etil) amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Método A

(2- dietilamino- etil)- amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (598 g), y diclorometano (60 mL) en un baño helado fueron tratados con ácido 3- cloroperbenzoico (336 mg). Y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. El solvente fue evaporado por rotovapor y el residuo suspendido en etanol (20 mL). Se agregó agua (20 mL) conteniendo hidróxido de sodio (240 mg) y la mezcla fue agitada durante una 1 hora. El precipitado fue recolectado mediante filtración al vacío, lavado con 5 mL de agua y secado al vacío para proporcionar (2- dietil- N- oxoammonio- etil)- amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (510 mg, rendimiento 82). Como un sólido anaranjado.] ¹H-NMR (DMSO-d₆) 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), 6.84 (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

(2- dietilamino- etil) amida del ácido 5- formil- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (10 g) fue suspendido en diclorometano (100 mL) y enfriado en un baño helado. Se agregó ácido 3- cloro- peroxibenzoico (13.1g) con agitación y la mezcla fue dejada calentar a temperatura ambiente y luego agitada durante la noche. La mezcla fue evaporada hasta

312

sequedad y cromatografada sobre una columna de gel de sílice eluyendo con metanol al 20% en diclorometano. Las fracciones que contiene el producto fueron combinadas y evaporadas hasta sequedad para proporcionar (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, rendimiento 83%), y pirrolidina (9 g, rendimiento 83%) (0.1g) fueron sometidas a reflujo en etanol (30 mL) durante 4 horas. La mezcla fue enfriada en un baño helado y el precipitado recolectado mediante filtración al vacío y lavada con etanol. Los sólidos fueron agitados en acetato de etilo (30 mL), recolectados mediante filtración al vacío, lavados con acetato de etilo y secados al vacío para proporcionar (2- dietil- N- oxoamino- etil)- amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (10. 3g rendimiento 80%) como un sólido anaranjado.

¹H-NMR (DMSO-d₆) 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), 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)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (120 mg, 0.4 mmol) fue agitado con EDC, HCl (96 mg, 0.5 mmol), 1- hidroxi- benzotriazol anhidro (68 mg, 0.5 mmol), y 2- (2- aminoetilpiridina adquirido en Aldrich en DMF anhidro (3 mL) durante 2- 3 días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue diluida con NaHCO₃ 1M (1.5 mL), luego con 8 ml de agua. El producto crudo precipitado fue recolectado mediante filtración, lavado con agua, secado y purificado mediante cristalización o cromatografía para proporcionar [2- (piridin- 1il)- etil] amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico.

33

Ejemplo 189

[2- (piridin- 1- il)etil]- amida del ácido 5- [5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Procediendo tal como se describió en el ejemplo anterior pero substituyendo el ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico por el ácido 5- [5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (127 mg) se proporcionó [2- (piridin- 1- il)etil] amida del ácido 5- [5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico.

Ejemplo 192

[2- (piridin- 1- il)etil]- amida del ácido 5- [5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Procediendo tal como se describió en el ejemplo 190 anterior pero substituyendo el ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico con el ácido 5- [5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (127 mg) se proporcionó [2- (piridin- 1- il)etil] amida del ácido 5- [5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 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)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Procediendo tal como se describió en el ejemplo 190 anterior pero substituyendo el ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- iliden- metil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico por el ácido 5- [2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (113mg) se proporcionó [2- (piridin- 1- il)etil] amida del ácido 5- [2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico.

314

Ejemplo 203

[2- (piridin- 1- il)etil]- amida del ácido 5- [5- ciano- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Procediendo tal como se describió en el ejemplo 190 anterior pero substituyendo el ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico con el ácido 5- [5- ciano- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (123 mg) se proporcionó [2- (piridin- 1- il)etil] amida del ácido 5- [5- ciano- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico.

Ejemplo 142, 186, 187, 188 y 204

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192, y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil)piridina por 1- (2- aminoetil)pirrolidina adquirido de Aldrich Chemical Company, Inc. se proporcionaron los compuestos deseados.

Ejemplo 143- 147

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192 y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil)piridina por 1- (2- aminoetil)imidazol- 2- ona (preparado al calentar carbonato de dimetilo con bis(2- aminoetil)amina (2 equivalentes) en una matraz sellada hasta 150 °C durante 30 minutos, siguiendo el procedimiento descrito en la Patente U. S. 2613212 (1950), de Rohm & Haas Co. El producto crudo fue purificado sobre sílice utilizando una mezcla eluyente de cloroformo- metanol- amoníaco acuoso 80: 25: 2) se proporcionaron los compuestos deseados.

Ejemplos 148- 151 y 184

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192 y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil) piridina por éster etílico del ácido 4- (2- aminoetil)piperazina- 1- acético (preparado como sigue: éster etílico del ácido piperazina- 1- acético (11.22 g) fue tratado con yodoacetónitrilo (5.0 mL) en presencia de carbonato de potasio (6.9 g) en acetato de etilo (260 mL) a 0 °C. Después de terminar la adición de

315

yodoacetoniitrilo (45 min), la mezcla de reacción fue agitada subsecuentemente a temperatura ambiente durante 11 horas. La mezcla de reacción fue filtrada y los filtrados evaporados. El residuo fue hidrogenado en presencia de boruro de cobalto (preparado a partir de CoCl_2 y borohidruro de sodio) a temperatura ambiente a 50 psi durante 2 días en etanol. La filtración, evaporación y purificación cromatográfica utilizando una mezcla eluyente de cloroformo- metanol- amoniaco acuoso 80:25:2 proporcionó la amina deseada (3.306 g) como un aceite amarillo pálido) se proporcionaron los compuestos deseados.

Ejemplo 152 – 153

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192 y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil) piridina con “- [(2- aminoetilamino)]acetoniitrilo (preparado como sigue: una solución de yodoacetoniitrilo (5.0 mL) en alcohol etílico (80 ml) se agregó a una solución de diamina de etileno (150 ml) en alcohol etílico(60 mL) a 0 °C durante un periodo de 30 minutos. La agitación continuo durante otra 1 hr a 0 °C, luego a temperatura ambiente durante 14 horas. Se agregó 55 mmol de carbonato de potasio agitando durante 30 minutos, filtrando y el filtrado fue concentrado a temperatura ambiente. El residuo fue purificado sobre sílice utilizando una mezcla eluyente de cloroformo- metanol- amoniaco acuoso 80: 15: 1.5 para proporcionar 2- [(2- aminoetilamino)]- acetoniitrilo el cual fue utilizado inmediatamente) se proporcionaron los compuestos deseados.

Ejemplo 154- 158

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192 y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil) piridina con (3- aminopropil)- azepin –2- ona (preparado según el procedimiento en Kraft A: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705- 14, excepto que la hidrólisis de DBU fue realizada a 145 °C en presencia de hidróxido de litio (1 hr, 5 ml de DBU, 2 ml de agua, 420 mg de hidrato de hidróxido de litio). La purificación del producto crudo sobre sílice utilizando una mezcla eluyente de cloroformo- metanol- amoniaco acuoso 80:40:4 proporcionó (1- (3- aminopropil)azepin- 2- ona (4.973g, rendimiento 87%) se proporcionaron los compuestos deseados.

326

Ejemplos 133- 135, 159 y 200

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192 y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil) piridina con etilendiamina de N- acetilo (preparada al calentar una mezcla de acetato de etilo con diamina de etileno (1.5 equivalentes) a 160 °C durante 1 hr en un recipiente sellado. La destilación al vacío proporcionó el producto deseado en rendimiento del 56%. Diamina N- acetiletileno también esta disponible en Aldrich)

10 Ejemplos 146 - 140

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192 y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil) piridina por 1- (3- aminopropil)- tetrahidro- pirimidin- 2- ona (preparada en la misma forma que 1- (3- aminopropil)- azepin- 2- ona según en procedimiento en Kraft A: J.Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705- 14: Brevemente, 1,3,4,6,7,8- hexahidro- 2H- pirimido[1,2- a]pirimidina (4.939), hidrato de hidróxido de litio (918 mg) y 2 ml de agua se calentó sin un solvente en un recipiente sellado a 145 °C durante 1 hr. El producto crudo fue purificado sobre una columna de sílice en cloroformo- metanol- amoniaco acuoso 80: 40: 4 para proporcionar la amina pura (5.265g, rendimiento 94%).

20

Ejemplos 141, 160- 162 y 185

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192 y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil) piridina con 1- (2- aminoetil)- piperazina- 2- ona (preparada como sigue: se agregó por goteo cloruro de Pert- butildifenilsililo puro (25 mL, 97.7 mmol) en una solución de DBU (195 ml, 130 mmol) y bis (2- aminoetil)amina (4.32 mL, 40 mmol) en acetamida de dimetilo anhidro (80 mL) a temperatura ambiente ante enfriamiento en baño de agua durante 5 minutos. La mezcla fue agitada durante 5 horas. Se agregó éster etílico del ácido bromoacético puro (6.70 mL, 60 mmol) ante enfriamiento a temperatura ambiente. La reacción fue agitada durante 25 minutos, luego evaporada sobre

25

30

377

alto vacío. El residuo fue disuelto en metanol (200 mL), KHCO_3 (10g) y se agregó KF (12 g, 200 mmol) y la mezcla fue agitada a 60 °C durante 5 horas. Se agregó 10g de Na_2CO_3 , agitada durante 10 minutos, enfriada y filtrada. Los filtrados fueron evaporados. El residuo fue extraído con hexanos (2 veces 250ml). El material insoluble en hexano fue disuelto en etanol (60 mL), filtrado y evaporado. El residuo fue purificado sobre una columna de sílice en cloroformo- metanol- amoniaco acuoso 80: 40: 4 para proporcionar la amina pura(4.245g, rendimiento74%)) proporcionó los compuestos deseados.

Ejemplo 163- 167

Procediendo tal como se describió en los ejemplos 190, 189, 191, 192 y 203 anteriores pero substituyendo 2- (2- aminoetil) piridina con 3- [(2- aminoetil)amino]propionitrilo (preparado a partir diamina de etileno (150 mmol) y acrilonitrilo (50 mmol) en THF a temperatura ambiente, como se describió en Israel, M. Et al: *J. Med Chem.* 7, 1964, 710 –16, se proporcionó la amina deseada (4.294g)) se proporcionaron los compuestos deseados.

Ejemplo 168

[2- (4- metilpiperazin- 1- il)- etil]- amida del ácido 5- (5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

A una mezcla turbia amarilla del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 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 agregó reactivo BOP (199 mg). La mezcla se volvió clara en 5 minutos. Se agregó 2- (4- metilpiperazin- 1- il)etilamina¹ (51 mg) en la mezcla clara. La solución resultante fue agitada a temperatura ambiente durante la noche.

Los productos amarillos sólidos precipitados a partir del sistema de reacción. La cromatografía de capa delgada (metanol al 10% en cloruro de metileno) mostró que todo el material de inicio había sido convertido en el producto. El sólido fue aislado mediante filtración al vacío y lavado una vez con etanol (1 mL). El sólido fue sonificado en éter de dietilo (2 mL) durante 20 minutos y recolectado mediante filtración al vacío. Después de secar al vacío, se obtuvo (4- metilpiperazin- 1- il- etil)- amida del ácido 5- (5- fluoro- 2-

376

oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (79 mg, rendimiento 62%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.40, 2.42 (2xs 6H, 2xCH₃), 2.41 (m, 2H, CH₂), 2.47 (m, 8H, 4xCH₂), 3.30 (m, 2H, CH₂), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.82 (dd, J=4.5, 8.7 Hz, 1H), 6.91 (td, ²J=2.4, ³J=8.8 Hz, 1H), 7.43 (t, J= 5.6 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.75 (dd, J=2.8, 9.6 Hz, 1H), (aromático y vinilo), 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 5- (5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Siguiendo el procedimiento en el ejemplo 168 anterior pero sustituyendo el ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico por el ácido 5- [5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (95 mg, 0.3 mmol) se proporcionó (4- metilpiperazin- 1- il- etil)- amida del ácido 5- (5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 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, 2xCH₃), 2.42 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 8H, 4xCH₂), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.84 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.11 (dd, J=2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.44 (t, J= 5.6 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.97 (d, J=2.0, Hz, 1H), (aromático y vinilo), 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- ilidenmetil)- 2,4-dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 168 pero substituyendo el ácido 5- (5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3- ilidenmetil)- 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico por el ácido 5-(5-bromo- 2- oxo- 1,2- dihidro-indol- 3- ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico se proporcionó (4- metilpiperazin- 1- il- etil)-amida del ácido 5- (5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- 3-ilidenmetil)- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (39 mg, 54%) fue obtenido a partir de SU011670 (54 mg, 0.15 mmol).

39

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.41, 2.42 (2xs 6H, 2xCH₃), 2.42 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 8H, 4xCH₂), 3.31 (m, 2H, CH₂), 6.80 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.23 (dd, J=2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.44 (t, J= 5.6 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.09 (d, J=2.0, Hz, 1H), (aromático y vinilo), 10.99 (s, 1H, CONH). 13.61 (s, 1H, NH).LC-MS (m/z) 486.6 (M).

5

Ejemplo 172

(4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 168 pero substituyendo el ácido

10 5(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico SU014900 con el ácido 5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico proporcionó (4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico, (136 mg, 84%) fue obtenido (112.8 mg, 0.4 mmol)

15 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.39, 2.42 (2xs 6H, 2xCH₃), 2.42 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 8H, 4xCH₂), 3.30 (t, 2H, CH₂), 6.86 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.96 (t, J=7.4 Hz, 1H), 7.10 (t, J= 7.8 Hz, 1H), 7.41 (t, J=5.4, Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.76 (d, J=7.6 Hz, 1H) (aromático y vinilo), 10.88 (s, 1H, CONH). 13.61 (s, 1H, NH).LC-MS (m/z) 406.6 (M-1).

20 Ejemplo 171

[2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)-etil]amida del ácido 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

A una mezcla turbia amarilla agitada del ácido 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (112.8 mg, 0.4 mmol), DMF (0.5mL) y

25 trietilamina (0.111 mL) en un tubo de reacción de 20 mL, se agregó reactivo BOP (265 mg). La mezcla se volvió clara en 5 minutos. Se agregó 2-(2,6-dimetilpiperazin-1-il)etilamina (68.6 mg) (ver., Tapia, L. Alonso-Cires, P. Lopez-Tudanca, R. Mosquera, L. Labeaga, A. Innerarity, A. Orjales, J. Med. Chem., 1999, 42, 2870-2880). La solución resultante fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La cromatografía de capa

30 delgada (metanol al 10% en cloruro de metileno) mostró que todo el material de inicio

320

había sido convertido en el producto. La mezcla de reacción fue evaporada hasta sequedad y luego purificada mediante cromatografía rápida (CH₂Cl₂/CH₃OH=20/1) seguido por recristalización para proporcionar [2- (3,5- dimetilpiperazin- 1- il)etil]- amida del ácido 5- [2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (83 mg, rendimiento del 50%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1.15, 1.16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.95 (t, J= 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=8.0 Hz, 1H), 6.97 (t, J= 7.2, Hz, 1H), 7.11 (t, J= 7.8 Hz, 1H), 7.48 (t, J= 5.6 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.75 (d, J=7.6 Hz, 1H) (aromático y vinilo), 10.88 (s, 1H, CONH). 13.62 (s, 1H, NH).LC-MS (m/z) 422.2 (M+1).

Ejemplo 173

[2- (3,5- dimetilpiperazin- 2- il)etil] amida del ácido 5- [5- fluoro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

15 Siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 168 anterior el compuesto deseado fue obtenido (60 mg, 0.2 mmol).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 0.891, 0.907 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.49 (t, J= 10.4Hz, 2H) 2.40, 2.42 (2xs 6H, 2xCH₃), 2.41 (m, 2H, CH₂), 2.74 (m, 4H), 3.30 (m, 2H), 6.82 (dd, J=4.5, 8.7 Hz, 1H), 6.90 (td, ²J= 2.4, ³J= 8.4 Hz, 1H), 7.42 (t, J= 5.6 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 20 7.74 (dd, J=4.6, 8.4 Hz, 1H), (aromático y vinilo), 10.88 (s, 1H, CONH). 13.65 (s, 1H, NH).LC-MS (m/z) 438.4 (M-1).

Ejemplo 174

[2- (3,5- dimetilpiperazin- 1il)etil] amida del ácido 5- [5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

25 Siguiendo el procedimiento a partir del ejemplo 171 anterior el compuesto deseado (31.2 mg, 34%) fue obtenido a partir del ácido 5- [5- cloro- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico (63 mg, 0.2 mmol).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1.15, 1.16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.95 (t, J= 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 30

321

(m, 2H, CH₂), 6.85 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.11 (dd, J= 2.0, 8.0Hz, 1H), 7.52 (t, J= 5.6 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.97 (d, J=2.0 Hz, 1H) (aromático y vinilo), 10.99 (s, 1H, CONH). 13.63 (s, 1H, NH).LC-MS (m/z) 456.2 (M+1).

5 Ejemplo 175

[2- (3,5- dimetilpiperazin- 1- il)etil] amida del ácido 5- [5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 2,4- dimetil- 1H- pirrol- 3- carboxílico

Siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 171 anterior el compuesto descado (40mg, 40%) fue obtenido a partir del ácido 5- [5- bromo- 2- oxo- 1,2- dihidro- indol- (3Z)- ilidenmetil]- 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= 6Hz, 2H, CH₂) 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= 10.4 Hz, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.81 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 7.24 (dd, J=2.0, 8.4 Hz, 1H), 7.51 (t, J=5.6 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H). 8.10 (d, J=2.0 Hz, 1H) (aromático y vinilo), 10.99 (s, 1H, CONH). 13.62 (s, 1H, NH).LC-MS (m/z) 498.4 (M-1).

Ejemplo 205

(3Z)- 3- [(3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2- il)- metilideno]- 1- [1- (4- metilpiperazinil)metil]- 1,3- dihidro- 2H- indol- 2- ona.

Se agregó N- metilpiperazina (10 g, 100 mmol) a una solución de formaldehído acuoso (10 g de solución al 38%, 100 mmol) y 3- (3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2- ilmetilideno)- 1,3- dihidro- indol- 2- ona, (2.38 g, 10 mmol) en metanol (100 mL). La solución fue calentada a 60 °C durante 1 hr, concentrada a un volumen bajo y el precipitado fue filtrado, lavado con etanol, y secado para proporcionar 2.38 g del compuesto del título, mp 160- 164 °C.

HPLC Rt 4.72 min. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.26 (s, 3H), 2.38 (s, 3H) 2.43 (br s 4H), 2.70 (br, s, 4H), 2.70 (br, s, 4H), 4.59 (s, 2H), 5.96 (d, 1H), 7.02-7.08 (m, 2H), 7.15 (dd, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.48 (dd, 1H) y 13.0 (br s, Analizado. Calculado para C₁₂ H₂₆ N₄ O: C, 71.97; H, 7.48; N, 15.99. encontrado C, 71.75; H, 7.46; N, 15.87.)

322

(3Z)- 3- [(3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2- il)- metilideno]- 1- [4- metilpiperazinil)- metil]- 1,3- dihidro- 2H- indol- 2- ona fue convertido en una sal de dihidrocloruro.

Ejemplo 206

- 5 Síntesis de (3Z)- 3- [(3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2- il)- metilideno]- 1- (1- pirrolidinilmetil)- 1,3- dihidro- 2H- indol- 2- ona.

Se agrego pirrolidina (450 mg, 6.3 mmol) a una solución agitada de formaldehído acuoso (500 mg de solución 38%, 6.0 mmol) y 3- (3,5- dimetil- 1H- pirrol- 2- ilmetilideno)- 1,3- dihidro- indol- 2- ona, (900 mg, 3.8 mmol) en metanol (50 mL). Después de 15 minutos, la solución fue calentada a 0 °C el precipitado fue filtrado, lavado con agua, y
10 secado para proporcionar 1.08g del compuesto del título, mp 129- 132 °C. HPLC Rt 4.87 min. ¹H-NMR [(CD₃)₂SO] δ 1.65, (m, 4H), 2.32, (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.62 (m, 4H), 4.72 (s, 2H), 6.07 (d, 1H), 7.00 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.76 (d, 2H) y 13.1 (br s, 1H). Analizado. Calculado para C₂₀H₂₃N₃O: C, 74.74; 7.21; N, 13.07. Encontrado C, 74.61; 15 H, 7.25; N, 13.03.

Ejemplos Biológicos

Inhibidores de la Proteinkinasa de la Fórmula (I):

- 20 Los siguientes ensayos se pueden utilizar para determinar el nivel de actividad y efecto de los compuestos de la Fórmula (I) sobre una o más protequinasas (de aquí en adelante PKs). Se pueden diseñar ensayos similares a lo largo de las mismas líneas para cualquier PK utilizando técnicas bien conocidas en el estado de la técnica.

25 **A. Procedimientos de Ensayo**

- Varios de los ensayos descritos en la presente son realizados en un formato ELISA (Voller, 1980, "ELISA," Manual de Inmunología Clínica, segunda edición, Rose y Friedman, Am. Soc. of Microbiology, Washington, D.C., pp. 359- 371). El procedimiento general es como sigue: un compuesto de la fórmula (I) es introducido en células que
30 expresan la quinasa de prueba, de manera natural o recombinante, durante un periodo de

323

tiempo seleccionado después del cual, si la quinasa de prueba es un receptor, se agrega un ligando conocido que activa el receptor. Las células son sometidas a lisis y el lisado es transferido a los pozos de una placa ELISA previamente recubierta con un anticuerpo específico que reconoce el sustrato de la reacción de fosforilación enzimática.

- 5 Componentes que no hacen parte del sustrato del lisado celular son lavados y la cantidad de fosforilación sobre el sustrato es detectada con un anticuerpo que reconoce específicamente la fosfotirosina al realizar comparación con células de control que no estuvieron en contacto con un compuesto de prueba.

- 10 Los protocolos actualmente preferidos para realizar los experimentos ELISA para PKs específicas son proporcionados a continuación. Sin embargo, la adaptación de estos protocolos para determinar la actividad de los compuestos contra otras tirosinquinazas receptoras (RTKs), así como también para tirosinquinazas citoplásmicas (CTKs) y serina-treonina-tirosina-quinazas (STKs), está dentro del alcance del conocimiento de aquellos con experiencia en el estado técnica. Otros ensayos descritos en la presente miden la cantidad
- 15 de ADN elaborado en respuesta a la activación de una quinasa de prueba, la 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 de manera manual o recombinante, durante un periodo de tiempo seleccionado después del cual, si la quinasa de prueba es un receptor, se agrega un ligando conocido para activar
- 20 el receptor. Después de incubación al menos durante la noche, se agrega un reactivo de rotulación de ADN tal como la 5- bromodeoxiuridina (BrdU) o H3- timidina. La cantidad de ADN rotulado es detectada ya sea con un anticuerpo anti- BrdU) o H3- timidina. La cantidad de ADN rotulado es detectada ya sea con un anticuerpo anti- BrdU o midiendo la radioactividad y es comparada con las células de control que no estuvieron en contacto con
- 25 un compuesto de prueba.

BIOENSAYO GST-FLK-1

- 30 Este ensayo analiza la actividad de la tirosinquinasa de GST-Flk1 sobre polipéptidos (glu, tyr).

324

Materiales y Reactivos:

1. Placas ELISA Corning de 96 pozos (catálogo Corning No. 5805-96).
- 5 2. poly(glu, tyr) 4:1, liofilizado (Catálogo Sigma #P0275).
3. Preparación de placas de ensayo recubiertas poly(glu. tyr) (pEY): Recubrir 2 ug/pozo de poly(glu, tyr) (pEY) en 100 ul de PBS, mantener a temperatura ambiente durante dos horas o 4°C durante la noche. Recubrir las placas bien para prevenir evaporación
4. Amortiguador PBS: para 1L, mezclar 0.2 g de KH₂PO₄, 1.15 g de Na₂HPO₄, 0.2 g de
- 10 KCl y 8g de NaCl en aproximadamente 900 ml de dH₂O. Cuando todos los reactivos se han disuelto, ajustar el pH a 7.2 con HCl. Llevar el volumen total a 1L con dH₂O.
5. Amortiguador PBST: para 1L de amortiguador PBS, agregar 1.0 ml de Tween-20.
6. TBB . Amortiguador Bloqueador: para 1L, mezclar 1.21 g de TRIS, 8.77 g de NaCl, 1 ml de TWEEN-20 en aproximadamente 900 ml de dH₂O. Ajustar el pH a 7.2 con HCl. agregar
- 15 10g de BSA, agitar para disolver. Elevar el volumen total a 1L con dH₂O. filtrar para retirar la materia particulada.
7. BSA al 1% en PBS: Para preparar una solución de trabajo 1X, agregar 10 g de BSA a aprox. 990 ml de amortiguador PBS, agitar para disolver. Ajustar el volumen total a 1L con amortiguador PBS, filtrar para retirar la materia particulada.
- 20 8. Hepes 50 mM pH 7.5.
9. GST-FIk1cd purificado a partir de transformación de baculovirus recombinante sf9 (SUGEN, Inc).
10. DMSO al 4% en dH₂O.
11. ATP 10 mM en dH₂O.
- 25 12. MnCl₂ 40 mM
13. Amoriguador de Dilución de Quinasa (KDB): mezclar 10 ml de Hepes (pH 7.5), 1 ml de NaCl 5M, 40 uL de ortovanadato de sodio 100 mM y 0.4 ml de BSA al 5% en dH₂O con 88.56 ml de dH₂O.
14. Placas de polipropileno de fondo en V de 96 pozos NUNC, catálogo científico aplicado
- 30 # AS-72092

327

15. EDTA: mezclar 1.12 g de ácido etilendiamiotetraacético (EDTA) con aprox. 70 ml de dH₂O. Agregar 10 N NaOH hasta disolver EDTA. Ajustar pH a 8.0. Ajustar volumen total a 100 ml con dH₂O.

5 16. Amortiguador de Dilución de Anticuerpo 1°: mezclar 10 ml de BSA al 5% en amortiguador PBS con 89.5 ml de TBST.

17. Anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina conjugado a peroxidasa de horsetradish (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech).

18. Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS, Moss, Cat. No. ABST).

19. SDS al 10%.

10

Procedimiento:

1. Recubrir las placas ELISA de 96 pozos con 2 µg de péptido polyEY PBS estéril como se describió en el paso 3 de materiales y reactivos.

15 2. Retirar en líquido no unido de los pozos invirtiendo la placa.

3. Agregar 100 µl de BSA al 1% en PBS a cada pozo. Incubar con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. Repetir el paso 2.

5. Empapar los pozos con HEPES 50 mM (pH 7.5) (150 µl/pozo).

20 6. Diluir el compuesto de prueba con dH₂O/DMSO al 4% hasta 4 veces la concentración de ensayo final deseada en placas de polipropileno de 96 pozos.

7. Agregar 25 µl del compuesto de prueba diluido a la placas ELISA. En pozos de control, colocar 25 µl de dH₂O/DMSO al 4%.

8. Agregar 25 µl de 40 mM MnCl₂ con 4x ATP (2 µM) a cada pozo.

25 9. Agregar 25 µl EDTA 0.5 M a pozos de control negativo.

10. Diluir GST-Flk1 a 0.005 µg(5 ng)/pozo con KDB.

11. Agregar 50 µl de enzima diluida a cada pozo.

12. Incubar con agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

13. Detener la reacción agregando 50 µl de 250 mM EDTA (pH 8.0).

30 14. Lavar 3X con TBST y placa tocar sobre toalla de papel para remover líquido

296

de exceso.

15. Agregar 100 µl de conjugado HRP anti-fosfotirosina por pozo, 1:5,000 dilución en amortiguador de dilución de anticuerpos. Incubar, con agitación, durante 90 minutos a temperatura ambiente.
- 5 16. Lavar como en el paso 14.
17. Agregar 100 µl de solución ABTS a temperatura ambiente a cada pozo.
18. Incubar, con agitación, durante 10 a 15 minutos. Retirar burbujas.
19. Detener la reacción agregando 20 µl de SDS al 10% a cada pozo.
20. Leer los resultados sobre un lector Dynatech MR7000 ELISA con filtro de prueba a 410 nM y filtro de referencia a 630 nM.
- 10

BIOENSAYO PYK2

Este ensayo es utilizado para medir la actividad de la kinasa en vitro de pyk2 de longitud total rotulado con epítopo HA (FL.pyk2-HA) en un ensayo ELISA.

Materiales y reactivos:

- 15 1. Placas Elisa Corning de 96 pozos.
2. anticuerpo monoclonal anti-HA 12CA5 (SUGEN, Inc.)
3. PBS (Solución Salina Amortiguada por Fosfato de Dulbecco (Catálogo Gibco # 450-1300EB)
4. Amortiguador TBST: para 1 L, mezclar 8.766 g de NaCl, 6.057 g TRIS y 1 ml de 0.1% Triton X-100 en aprox. 900 ml dH₂O. Ajustar pH a 7.2, elevar volumen to 1 L.
- 20 5. Amortiguador Bloqueador: para 1 L, mezclar 100 g de 10% BSA, 12.1 g de 100 mM TRIS, 58.44 g de 1M NaCl y 10 mL de 1% TWEEN-20.
6. FL.pyk2-HA de lisatos celulares sf9 (SUGEN, Inc.).
- 25 7. DMSO al 4% en H₂O MilliQue.
8. ATP 10mM en dH₂O.
9. 1M MnCl₂.
10. 1M MgCl₂.
11. 1M Ditiotritol (DTT).

327

- 12. Fosforilación de amortiguador de quinasa 10X: mezclar 5.0 ml de 1M Hepes (pH 7.5), 0.2 ml 1M MnCl₂, 1.0 ml de 1 M MgCl₂, 1.0 ml de Triton X-100 al 10% en 2.8 ml de dH₂O. Poco antes de utilizar, agregar 0.1 ml de 1M DTT.
- 13. Placas de polipropileno con fondo en V de 96 pozos NUNC.
- 5 14. EDTA 500 mM en dH₂O.
- 15. Amortiguador de dilución de anticuerpos: para 100 mL, 1 mL de BSA/PBS al 5% y 1 mL Tween-20 al 10% en 88 mL de TBS.
- 16. HRP-conjugated anti-Ptyr PY99 conjugado con HRP, Santa Cruz Biotech Cat. No. SC-7020.
- 10 17. ABTS, Moss, Cat. No. ABST-2000.
- 18. SDS al 10%.

Procedimiento:

- 1. Recubrir las placas ELISA Corning de 96 pozos con 0.5 µg anticupero anti-HA 12CA5 en 100 µl de PBS por pozo. Almacenar durante la noche a 4°C.
- 15 2. Retirar el anticuerpo HA no unido de los pozos invirtiendo la placa. Lavar la placa con dH₂O. Tocar la placa sobre papel toalla para remover el líquido de exceso.
- 3. Agregar 150 µl de Amortiguador Bloqueador a cada pozo. Incubar con agitación, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 20 4. Lavar la placa 4x con TBS-T.
- 5. Diluir lisato en PBS (1.5 µg lisato/100 µl PBS).
- 6. Agregar 100 µl de lisato diluido a cada pozo. Agitar a temperatura ambiente durante 1 hr.
- 7. Lavar como en el paso 4.
- 25 8. Agregar 50 µl de 2X amortiguador de quinasa a LA placa ELISA que contiene pyk2-HA capturado.
- 9. Agregar 25 µL de compuesto de prueba 400 uM en DMSO al 4% a cada pozo. Para pozos de control utilizar DMSO al 4% solamente.
- 10. Agregar 25 µL de EDTA 0.5 M a pozos de control negativo.

328

11. Agregar 25 µl de 20 µM ATP a todos los pozos. Incubar con agitación, durante 10 minutos.
12. Detener la reacción agregando 25 µl de EDTA 500 mM (pH 8.0) a todos los pozos.
- 5 13. Lavar como en el paso 4.
14. Agregar 100 µL de anti-Ptyr conjugado HRP diluido 1:6000 en Amortiguador de dilución de anticuerpos a cada pozo. Incubar, con agitación durante 1 hr. a temperatura ambiente.
15. Lavar placa 3X con TBST y 1X con PBS.
- 10 16. Agregar 100 µL de solución ABST a cada pozo.
17. Si es necesario, detener el desarrollo de la reacción agregando 20 µL de SDS al 10% a cada pozo.
18. Leer la placa sobre un lector ELISA con filtro de prueba a 410 nM y filtro de referencia a 630 nM.

15

BIOENSAYO FGFR1

Este ensayo es utilizado para medir la actividad de la quinasa in vitro de FGF1-R en un Ensayo ELISA.

20 Materiales y reactivos:

1. Placas ELISA de 96 pozos Costar (Corning Catálogo # 3369).
 2. Poli(Glu-Tyr) (Sigma Catalog # PO275).
 3. PBS (Catálogo Gibco # 450-1300EB)
 4. Solución de Amortiguador Hepes 50 mM.
 - 25 5. Amortiguador Bloqueador (BSA al 5%/PBS).
 6. GST-FGFR1 purificado (SUGEN, Inc.)
 7. Amortiguador de Dilución de Quinasa.
- Mezclar 500 µl de Hepes 1M (GIBCO), 20 µl de BSA al 5%/PBS, 10 µl de 100mM ortovanadato de sodio y 50 µl de NaCl 5M.

2301

- 8. ATP 10mM
- 9. Mezcla de fosforilación ATP/MnCl₂: mezclar 20 µL de ATP, 400 µL de MnCl₂ 1M y 9.56 ml de dH₂O.
- 10. Placas de polipropileno con fondo en V de 96 pozos NUNC (Applied Scientific Catalog # AS-72092).
- 11. EDTA 0.5M.
- 12. TBST al 0.05%
Agregar 500 µL de TWEEN a 1 litro de TBS.
- 13. suero anti-fosfotirosina policlonal de conejo (SUGEN, Inc.).
- 14. conjugado de peroxidasa IgG cabra anti-conejo (Biosource, Catalog # ALI0404).
- 15. Solución ABTS.
- 16. Solución ABTS/H₂O₂.

Procedimiento:

- 1. Recubrir las placas ELISA Costar de 96 pozos con 1 µg de Poly(Glu,Tyr) por pozo en 100µl de PBS. Almacenar durante la noche a 4° C.
- 2. Lavar las placas cubiertas una vez con PBS.
- 3. Agregar 150 µL de Amortiguador Bloqueador BSA al 5%/PBS a cada pozo. Incubar con agitación, durante 1 hr a temperatura ambiente.
- 4. Lavar la placa 2x con PBS, luego una vez con Hepes 50mM. Tocar las placas sobre papel toalla para remover líquido de exceso y burbujas.
- 5. Agregar 25µL de compuesto de prueba 0.4 mM en DMSO al 4% o DMSO al 4% solo (controles) a la placa.
- 6. Diluir GST-FGFR1 purificado en Amortiguador de Dilución de Quinasa (5 ng de quinasa/50ul de KDB/pozo).
- 7. Agregar 50µL de quinasa diluida a cada pozo.
- 8. Arrancar la reacción de quinase agregando 25µl/pozo de ATP/Mn++ recién preparado (0.4 ml 1M MnCl₂, 40 µL de 10 ATP 10 mM, 9.56 ml de dH₂O), recién preparado).

330

- 9. Esta es una reacción de quinasa rápida y se debe detener con con 25µL de EDTA 0.5M en una forma similar a la adición de ATP.
- 10. Lavar la placa 4x con TBST fresco.
- 11. Completar el Amortiguador de dilución de anticuerpos: Per 50 ml:
5 Mezclar 5 ml de BSA al 5%, 250 µl de leche al 5% y 50 µl de vanadato de sodio 100mM, llevar al volumen final volumen con TBST al 0.05%.
- 12. Agregar 100 µl por pozo de anti-fosfotirosina (1:10000 dilución en ADB). Incubar con agitación durante 1 hr. a temperatura ambiente.
- 13. Lavar como en el paso 10.
- 10 14. Agregar 100 µl por pozo de Conjugado de peroxidasa IgG anti-conejo de cabra Biosource (1:6000 dilución en ADB). Incubar con agitación durante 1 hr. a temperatura ambiente.
- 15. Lavar como en el paso 10 y luego con PBS para remover burbujas y TWEEN de exceso.
- 15 16. Agregar 100 µl de Solución de ABTS/H2O2 a cada pozo.
- 17. Incubar con agitación, durante 10 a 20 minutos. Retirar burbujas.
- 18. Leer el ensayo sobre el lector ELISA Dynatech MR7000: filtro de prueba a 410 nM, filtro de referencia a 630 nM. .

BIOENSAYO EGFR

20 Este ensayo es utilizado para la actividad de la quinasa en vitro de FGF1-R en un Ensayo ELISA.

Materiales y reactivos:

- 1. Placas Elisa Corning de 96 pozos.
- 2. Anticuerpo anti-EGFR monoclonal SUMO1 (SUGEN, Inc.).
- 25 3. PBS
- 4. Amortiguador TBST
- 5. Amortiguador Bloqueador: para 100 ml, mezclar 5.0 g de leche instantánea no grasa Carnation® con 100 ml de PBS.
- 6. Lisato celular A431 (SUGEN, Inc.).

331

7. Buffer TBS:
 8. TBS + DMSO al 10%: para 1L, mezclar 1.514 g de TRIS, 2.192 g de NaCl y 25 ml de DMSO; llevar a 1 litro el total volumen con dH₂O.
 9. ATP (Adenosina-5'-trifosfato, a partir de musculo equino, Sigma Cat. No. A-5394), solución 1.0 mM en dH₂O. Este reactivo se debe utilizar inmediatamente antes de utilizar y se debe mantentener en hielo.
 10. MnCl₂ 1.0 mM
 11. Mezcla de fosforilación ATP/MnCl₂: para preparar 10 ml, mezclar 300 µl de 1 ATP 1 mM, 500 µl de MnCl₂ y 9.2 ml de dH₂O. Preparar poco antes de utilizar, mantener en hielo.
 12. Placas de polipropileno con fondo en V de 96 pozos NUNC.
 13. EDTA.
 14. Suero anti-fosfotirosina policlonal de conejo(SUGEN, Inc.).
 15. Conjugado de peroxidasa IgG anti-conejo de cabra (Biosource Cat. No. ALI0404).
 16. ABTS.
 17. Peroxido de hidrógeno al 30%.
 18. ABTS/H₂O₂.
 19. HCl 0.2 M.
- 20 Procedimiento:
1. Recubrir las placas ELISA Corning de 96 pozos con 0.5 µg de SUMO1 en 100 µl de PBS por pozo, almacenar durante la noche a 4° C.
 2. Remover SUMO1 no unido de los pozos invirtiendo la placa para remover liquido. Lavar 1x con dH₂O. Tocar la placa sobre papel toalla para remover líquido de exceso.
 3. Agregar 150 µl de Amortiguador Bloqueador a cada pozo. Incubar con agitación durante 30 min. a temperatura ambiente.
 4. Lavar placa 3x con agua desiónizada, luego una vez con TBST. Tocar la placa sobre papel toalla para remover líquido de exceso y burbujas.
 5. Diluir lisato en PBS (7 µg de lisato/100 µl de PBS).

332

6. Agregar 100 µl de lisato diluido a cada pozo. Agitar a temperatura ambiente durante 1 hr.
7. Lavar las placas como en el paso 4, anterior.
8. Agregar 120 µl de TBS a la Placa ELISA que contiene EGFR capturado
- 5 9. Diluir el compuesto de prueba 1:10 en TBS, colocar en el pozo.
10. Agregar 13.5 µl de compuesto de prueba diluido a la placa ELISA. Para controlar pozos, agregar 13.5 µl de TBS en DMSO al 10%.
11. Incubar con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Agregar 15 µl de mezcla de fosforilación a todos los pozos excepto el pozo de control negativo. El volumen final de pozo debe ser aproximadamente 150 µl con concentración final de ATP 3 µM/5 mM MnCl₂ 5mM en cada pozo. Incubar con agitación durante 5 minutos.
- 10 13. Detener la reacción agregando 16.5 µl de solución de EDTA con agitación. Agitar durante 1 min más.
- 15 14. Lavar 4x con water desionizada, 2x con TBST.
15. Agregar 100 µl de anti-fosfotirosina (dilución 1:3000 en TBST) por pozo. Incubar con agitación, durante 30-45 min. a temperatura ambiente.
16. Lavar como en el paso 4, anterior.
17. Agregar 100 µl de conjugado de peroxidasa IgG anti-conejo de cabra Biosource (dilución 1:2000 en TBST) a cada pozo. Incubar con agitación durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 20 18. Lavar como en el paso 4, anterior.
19. Agregar 100 µl de solución de ABTS/H₂O₂ a cada pozo.
20. Incubar de 5 a 10 minutos con agitación. Retirar las burbujas.
- 25 21. Si es necesario, detener la reacción agregando 100 µl HCl 0.2 M por pozo.
22. Leer el ensayo sobre un lector ELISA Dynatech MR7000: filtro de prueba a 410 nM, filtro de referencia a 630 nM.

BIOENSAYO PDGR

333

Materiales y reactivos:

- 5 1. **Placas Elisa Corning de 96 pozos**
2. **anticuerpo anti-PDGFR monoclonal 28D4C10 (SUGEN, Inc.).**
3. **PBS.**
4. **Amortiguador TBST.**
5. **Amortiguador Bloqueador (Igual que para el bioensayo EGFR).**
- 10 6. **Lisato NIH 3T3 celular que expresa PDGFR- β (SUGEN, Inc.).**
7. **Amortiguador TBS.**
8. **TBS + DMSO al 10%.**
9. **ATP.**
10. **MnCl₂.**
- 15 11. **Mezcla de fosforilación de amortiguador de quinasa: para 10 ml, mezclar**
 250 μ l de TRIS 1M, 200 μ l de NaCl 5M, 100 μ l de MnCl₂ 1M y 50 μ l de
 Triton X-100 100 mM en suficiente dH₂O para preparar 10 ml.
12. **Placas de polipropileno con fondo en V de 96 pozos NUNC.**
13. **EDTA.**
- 20 14. **Suero anti-fosfotirosina policlonal de conejo (SUGEN, Inc.).**
15. **Conjugado de peroxidasa IgG anti-conejo (Biosource Cat. No. ALI0404).**
16. **ABTS.**
17. **Peroxido de hidrógeno, solución al 30%.**
18. **ABTS/H₂O₂.**
- 25 19. **HCl 0.2 M.**
- 20.

Procedimiento:

1. Recubrir las placas ELISA Corning de 96 pozos con 0.5 µg de 28D4C10 en 100 µl de PBS por pozo ,almacenar durante la noche a 4° C.
2. Retirarl el 28D4C10 no unido de los pozos invirtiendo la placa para remover

331

liquido. Lavar 1x con dH₂O. Tocar la placa sobre papel toalla para retirar el líquido de exceso.

3. Agregar 150 µl de Amortiguador Bloqueador a cada pozo. Incubar durante 30 min. a temperatura ambiente con agitación.
- 5 4. Lavar la placa 3x con agua desionizada, luego una vez con TBST. Tocar la placa sobre papel toalla para remover el líquido de exceso y burbujas.
5. Diluir el lisato en HNTG (10 µg de lisato/100 µl de HNTG).
6. Agregar 100 µl de lisato diluido a cada pozo. Agitar a temperatura ambiente durante 60 min.
- 10 7. Lavar las placas como se describió en Paso 4.
8. Agregar 80 µl de mezcla de amortiguador de quinasa de trabajo a la placa ELISA que contiene PDGFR capturado.
9. Diluir el compuesto de prueba 1:10 en TBS en placas de polipropileno de 96 pozos.
- 15 10. Agregar 10 µl de compuesto de prueba diluido a la placa ELISA. Para controlar los pozos, agregar 10 µl de TBS + DMSO al 10%. Incubar con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Agregar 10 µl de ATP directamente a todos los pozos excepto el pozo de control negativo (el volumen final de pozo debe ser aproximadamente 100 µl con 20 µM de ATP en cada pozo.) Incubar 30 minutos con agitación.
- 20 12. Detener la reacción agregando 10 µl de solución EDTA a cada pozo.
13. Lavar 4x con agua desionizada, dos veces con TBST.
14. Agregar 100 µl de anti-fosfotirosina (dilución 1:3000 en TBST) por pozo. Incubar con agitación durante 30-45 min. a temperatura ambiente.
- 25 15. Lavar como en el paso 4.
16. Agregar 100 µl de conjugado de peroxidasa IgG anti-conejo de cabra Biosource (dilución 1:2000 en TBST) a cada pozo. Incubar con agitación durante 30 min. a temperatura ambiente.
17. Lavar como en el paso 4.

233

18. Agregar 100 µl de solución de ABTS/H₂O₂ a cada pozo.
19. Incubar de 10 a 30 minutos con agitación. Retirar burbujas.
20. Si es necesario detener la reacción con la adición de 100 µl de HCl 0.2M por pozo.
- 5 21. Leer el ensayo sobre un lector ELISA Dynatech MR7000 con filtro de prueba a 410 nM y filtro de referencia a 630 nM.

ENSAYO DE QUINASA CELULAR HER-2

- 10 Este ensayo se utiliza para medir la actividad de la quinasa HER-2 en células completas en un formato ELISA.

Materiales y reactivos:

- 15 1. DMEM (Catálogo Gibco #11965-092).
2. Suero Bovino Fetal (FBS, Catálogo Gibco #16000-044), calor inactivado en un baño de agua durante 30 minutos a 56 °C
3. Tripsina (Catálogo Gibco #25200-056).
4. L-Glutamina (Catálogo Gibco #25030-081)
- 20 5. HEPES (Catálogo Gibco #15630-080).
6. Medio de Desarrollo
Mezclar 500 ml de DMEM, 55 ml de FBS inactivado por calor, 10 ml de HEPES y 5.5 ml de L-Glutamina.
7. Medio Starve
- 25 Mezclar 500 ml de DMEM, 2.5 ml de FBS inactivado por calor, 10 ml de HEPES y 5.5 ml de L-Glutamina.
8. PBS.
9. Placas de Microtítulos de Cultivo de Tejidos de 96 pozos de fondo plano (Corning Catalog # 25860).
- 30 10. Platos de Cultivo de tejido de 15 cm (Corning Catálogo #08757148).

11. Placas Elisa Corning de 96 pozos.
12. Placas de polipropileno con fondo en V de 96 pozos NUNC.
13. Cartuchos de Transferencia Costar para el Transtar 96 (Costar Catálogo #7610).
- 5 14. SUMO 1: anticupero anti-EGFR monoclonal (SUGEN, Inc.).
15. Amortiguador TBST.
16. Amortiguador Bloqueador : 5% de leche instantánea Carnation® en PBS.
17. Ligando EGF: EGF-201, Shinko American, Japan. Suspende polvo en 100 uL de HCl 10mM. Agregar 100uL de NaOH 10 mM. Agregar 800 uL de PBS y transferir a un tubo Eppendorf, almacenar a -20°C hasta que esta listo para utilizar.
- 10 18. Amortiguador de lisis HNTG
Para solución concentrada 5X HNTG, mezclar 23.83 g de Hepes, 43.83 g de NaCl, 500 ml de glicerol y 100 ml de Triton X-100 y suficiente dH₂O para preparar 1 L de la solución total.
Para HNTG* 1X, mezclar 2 ml de HNTG, 100 µL de Na₃VO₄ 0.1M, 250 µL de Na₄P₂O₇ 0,2M 100 µL de EDTA.
- 15 19. EDTA.
- 20 20. Na₃VO₄. Para preparar la solución concentrada, mezclar 1.84 g de Na₃VO₄ con 90 ml de dH₂O. Ajustar pH a 10. Bullir en un microondas durante un minuto (solución se vuelve transparente). Enfriar hasta temperatura ambiente. Ajustar el pH a 10. Repetir el ciclo de calentamiento/enfriamiento hasta que el pH permanece en 10.
21. Na₄P₂O₇ 200 mM
- 25 22. Antisuero policlonal de conejo específico para fosfotirosina (anticuerpo anti-Ptyr, SUGEN, Inc.).
23. Antisuero purificado por cromatografía de afinidad, anticuerpo IgG anti-conejo de cabra, conjugado de peroxidasa (Biosource Cat # ALI0404).
24. Solución ABTS.
- 30 25. Solución de hidrógeno de Peroxido al 30 %.

337

- 26. ABTS/H₂O₂.
- 27. HCl 0.2 M.

Procedimiento:

- 5 1. Recubrir las placas ELISA Corning de 96 pozos con SUMO1 a 1.0 ug por pozo en PBS, 100 ul de volumen final/pozo. Almacenar durante la noche a 4°C.
- 2. El día de uso, retirar el amortiguador de recubrimiento y lavar la placa 3 veces con dH₂O y una vez con Amortiguador TBST. Todas las lavadas en
10 este ensayo se deben realizar en esta forma, amenos que se especifique lo contrario.
- 3. Agregar 100 ul de Amortiguador Bloqueador a cada pozo. Incubar la placa con agitación duante 30 min. a temperatura ambiente. Poco antes de utilizar, lavar placa.
- 15 4. Utilizar la línea celular EGFr/HER-2 chimera/3T3-C7 para este ensayo.
- 5. Elegir platos con 80-90% de confluencia. Recolectar células mediante tripsinización y centrifuga a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min.
- 6. Resuspender células en medio starve y contar con azul trypan. La viabilidad
20 por encima de 90% es requerida. Plantar células en medio starve Seed cells en starve a una densidad de 2.500 células por pozo, 90 ul por pozo, en una placa de microtítulos de 96 pozos. Incubar las células sembradas durante la noche a 37° bajo CO₂ al 5%
- 7. Comenzar el ensayo dos días después de sembrar.
- 25 8. Los compuestos de prueba son disueltos en DMSO al 4%. Las muestras son luego diluidas adicionalmente directamente sobre las placas con starve-DMEM. Tipicamente, esta dilución será 1:10 o más. Todos los pozos son luego transferidos a la placa de células a una dilución adicional 1:10 (10µl de muestra y medio en 90 µl de medio starve. La concentración final de
30 DMSO debe ser 1% o menos. Se puede utilizar una dilución serial estándar.

33^{eb}

9. Incubar bajo CO₂ al 5% a 37°C durante 2 hours.
10. Preparar ligando EGF mediante dilución de EGF concentrado (16.5 uM) en DMEM caliente hasta 150 nM.
11. Preparar HNTG* fresco suficiente para 100 ul por pozo; colocar en hielo.
- 5 12. despues de 2 horas de incubación con compuesto de prueba, agregar el ligando EGF a las células, 50 ul por pozo, para una concentración final de 50 nM. Los pozos de control positivo reciben la misma cantidad de EGF. Los controles negativos no reciben EGF. Incubar a 37° C durante 10 min.
- 10 13. Retirar el compuesto de prueba, EGF, y DMEM. Lavar las células una vez con PBS.
14. Transferir HNTG* a las células, 100 ul por pozo. Colocar en hielo durante 5 minutos. Entretanto, retirar el Amortiguador Bloqueador de la Placa ELISA y lavar.
- 15 15. Raspar las células de la placa con a micropipeta y homogenizar el material celular mediante aspiración y dispensación repetida de amortiguador de lisis HNTG*. Transferir el lisato a una placa ELISA recubierta, bloqueada, lavada. Or, utilizar un cartucho de transferencia Costar para transferir el lisato a la placa.
- 20 16. Incubar con agitación, a temperatura ambiente durante 1 hr.
17. Retirar el lisato, lavar. Transferir el anticuerpo anti-Ptyr reciente diluido (1:3000 en TBST) a la Placa ELISA, 100 ul por pozo.
18. Incubar, con agitación, a temperatura ambiente, duante 30 min.
19. Retirar el anticuerpo anti-Ptyr, lavar. Transferir el anticuerpo BIOSOURCE recién diluido BIOSOURCE a la placa ELISA(1:8000 en TBST, 100 ul por pozo).
- 25 20. Incubar con agitación, a temperatura ambiente durante 30 min.
21. Retirar el anticuerpo BIOSOURCE, lavar. Transferir la solución recién preparada de ABTS/H₂O₂ a la placa ELISA, 100 ul por pozo.
22. Incubar con agitación, durante 5-10 minutos. Retirar burbujas.
- 30 23. Detener la reacción con la adición de 100ul de HCl 0.2 M por pozo.

32el

24. Leer en el lector ELISA Dynatech MR7000 con filtro de prueba colocado a 410 nM y filtro de referencia a 630 nM.

ENSAYO DE CDK2/CICLINA A

5 Este ensayo se utiliza para medir la actividad de la quinasa serina/treonina in vitro de cdk2/ciclina A humana en un ensayo de Centelleo por proximidad (SPA).

Materiales y reactivos.

- | | |
|----|--|
| 10 | 1. Placas de polietileno-terestato Wallac (flexi) de 96 pozos (Wallac Catálogo # 1450-401). |
| | 2. ATP [$\gamma^{33}\text{P}$] Amersham Redivue (Amersham catálogo #AH 9968). |
| | 3. Streptavidina Amersham recubierta con perlas SPA de poliviniltoleno (Amersham catálogo #RPNQ0007). Las perlas deben ser reconstituidas en PBS sin magnesio o calcio, a 20 mg/ml. |
| 15 | 4. Complejo enzimático activado de cdk2/cyclina A purificado a partir de células sf9 (SUGEN, Inc.). |
| | 5. sustrato peptídico biotinilado (Debtide). El biotin-X-PKTPKKAKKL peptídico is disuelto en dH ₂ O a una concentración de 5 mg/ml. |
| 20 | 6. Mezcla Péptido/ATP: para 10 ml, mezclar 9.979 ml de dH ₂ O, 0.00125 ml de ATP "frío", 0.010 ml de Debtide y 0.010 ml de ATP $\gamma^{33}\text{P}$. La concentración final por pozo será ATP "frío" 0.5 μM , 0.1 μg de Debtide y 0.2 μCi de $\gamma^{33}\text{P}$ ATP. |
| 25 | 7. Amortiguador de quinasa: para 10 ml, mezclar 8.85 ml de dH ₂ O, 0.625 ml de TRIS(pH 7.4), 0.25 ml de MgCl ₂ 1M, 0.25 ml de NP40 al 10% y 0.025 ml de 1M DTT 1M, agregado fresco poco antes de utilizar. |
| | 8. ATP 10 mM en dH ₂ O. |
| | 9. Tris 1M, pH ajustado a 7.4 con HCl. |
| | 10. MgCl ₂ 1M |
| | 11. DTT 1M |
| 30 | 12. PBS (Catálogo Gibco # 14190-144). |

340

- 13. EDTA 0.5M.
- 14. Solución de detención: Para 10 ml, mezclar 9.25 ml de PBS, 0.005 ml de ATP 100 mM, 0.1 ml de EDTA 0.5M, 0.1 ml de Triton X-100 al 10% y 1.25 ml de 20 mg/ml de perlas SPA.

5

Procedimiento:

- 1. Preparar soluciones de compuestos de prueba a 5x la concentración final deseada en DMSO al 5%. Agregar 10 ul a cada pozo. Para controles negativos, utilizar 10 ul de DMSO al 5% solo en los pozos.
- 10 2. Diluir 5 µl de solución de cdk2/ciclina A con 2.1 ml de amortiguador 2X de quinasa.
- 3. Agregar 20 ul de enzima a cada pozo.
- 4. Agregar 10 µL de EDTA 0.5M a los pozos de control negativo.
- 5. Comenzar la reacción de quinasa, agregar 20 µL de mezcla de péptido/ATP
- 15 a cada pozo. Incubar durante 1 hr. sin agitación.
- 6. Agregar 200 µl de solución de detención a cada pozo.
- 7. Mantener al menos 10 min.
- 8. Girar la placa a aprox. 2300 rpm durante 3-5 min.
- 9. Contar la placa utilizando un lector Trilux o similar.

20

ENSAYO DE TRANSFOSFORILACIÓN

Este ensayo se utiliza para medir los niveles de fosfotirosina sobre un substrato poli(ácido glutámico:tirosina (4:1)) como un medio para identificar agonistas/antagonistas de transfosforilación met del substrato.

25

Materiales y reactivos:

- 1. Placas Elisa Corning de 96 pozos, Corning Catálogo # 25805-96.
- 2. Poly(glu, tyr) 4:1, Sigma, Cat. No; P 0275.
- 3. PBS, Catálogo Gibco # 450-1300EB
- 30 4. HEPES 50 mM

331

5. Amortiguador Bloqueador: Disolver 25 g de Albumina de Suero Bovino, Sigma Cat. No A-7888, en 500 ml de PBS, filtrar a través de un filtro de 4 μm .
- 5 6. Proteína de fusión GST purificada que contiene el dominio de la quinasa Met, Sugén, Inc.
7. Amortiguador TBST.
8. DMSO acuoso al 10% (MilliQ H_2O).
9. Adenosin-5'-trifosfato (dH_2O) 10 mM acuoso, Sigma Cat. No. A-5394.
- 10 10. Amortiguador de Dilución de Quinasa 2X: para 100 ml, mezclar 10 mL de HEPES 1M a pH 7.5 con 0.4 mL de BSA/PBS al 5%, 0.2 mL de ortovanadato de sodio 0.1M y 1 mL de cloruro de sodio 5M en 88.4 mL de dH_2O .
11. Mezcla de Reacción ATP 4X: para 10 mL, mezclar 0.4 mL de cloruro de manganeso 1M y 0.02 mL de ATP 0.1 M en 9.56 mL de dH_2O .
- 15 12. Mezcla de controles negativos 4X: para 10 mL, mezclar 0.4 mL de cloruro de manganeso 1M en 9.6 mL de dH_2O .
13. Placas de polipropileno con fondo en V de 96 pozos NUNC, Catálogo Científico Aplicado # S-72092
14. EDTA 500 mM.
- 20 15. Amortiguador de dilución de anticuerpos: para 100 mL, mezclar 10 mL de BSA/PBS al 5%, 0.5 mL de leche instantánea Carnation® al 5% en PBS y 0.1 mL de ortovanadato de sodio 0.1M en 88.4 mL de TBST.
16. Anticuerpo antifosfotirosina policlonal de conejo, Sugén, Inc.
17. Anticuerpo conjugado de peroxidasa de pepino picante anticonejo de cabra, Biosource, Inc.
- 25 18. Solución ABTS Solución: para 1 L, mezclar 19.21 g de ácido cítrico, 35.49 g Na_2HPO_4 y 500 mg de ABTS con suficiente dH_2O para preparar 1 L.
19. ABTS/ H_2O_2 : mezclar 15 mL de solución ABST con 2 μL de H_2O_2 cinco minutos antes de utilizar.
- 30 20. 0.2 M

342

Procedimiento:

1. Recubrir las placas ELISA con 2 µg de Poly(Glu-Tyr) en 100 µL de PBS, almacenar durante la noche a 4 ° C.
- 5 2. Bloquear la placa con 150 µL de BSA al 5%/ PBS durante 60 min.
3. Lavar la placa dos veces con PBS, una vez con amortiguador Hepes 50 mM pH 7.4.
4. Agregar 50 µl de la quinasa diluida a todos los pozos. (La quinasa purificada es diluida con Amortiguador de Dilución de quinasa. La
- 10 concentración final debe ser 10 ng/pozo.)
5. Agregar 25 µL del compuesto de prueba (en DMSO al 4%) o DMSO solo (4% en dH₂O) para controles a la placa.
6. Incubar la mezcla de quinasa/compound durante 15 minutos.
7. Agregar 25 µL de MnCl₂ 40 mM a los pozos de control negativo.
- 15 8. Agregar 25 µL de la mezcla ATP/ MnCl₂ a los demás pozos (excepto los controles negativos). Incubar for 5 min.
9. Agregar 25 µL de EDTA 500 mM para detener la reacción.
10. Lavar placa 3x con TBST.
11. Agregar 100 µL de anti-Ptyr policlonal conejo diluido 1:10,000 en
- 20 Amortiguador de dilución de anticuerpos a cada pozo. Incubar con agitación, a temperatura ambiente durante una hora.
12. Lavar placa 3x con TBST.
13. Diluir anticuerpo anti-conejo conjugado Biosource HRP 1: 6,000 en
- 25 Amortiguador de dilución de anticuerpos. Agregar 100 µL por pozo e incubar a temperatura ambiente, con agitación, durante una hora.
14. Lavar placa 1X con PBS.
15. Agregar 100 µl de Solución ABTS/H₂O₂ a cada pozo.
16. Si es necesario, detener el desarrollo de la reacción con la adición de 100 µl de 0.2M HCl 0.2M por pozo.

323

17. Leer la placa sobre un lector ELISA Dynatech MR7000 con el filtro de prueba a 410 nM y el filtro de referencia a 630 nM.

ENSAYO DE TRANSFOSFORILACIÓN IGF-1

5 Este ensayo se utiliza para medir el nivel de fosfotirosina en poli(ácido glutámico:tirosina)(4:1) para la identificación de agonistas/antagonistas de transfosforilación gst-IGF-1 de a substrato.

Materiales y reactivos:

- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
1. Placas Elisa Corning de 96 pozos.
 2. Poly (Glu-tyr) (4:1), Sigma Cat. No. P 0275.
 3. PBS, Catálogo Gibco # 450-1300EB.
 4. HEPES 50 mM
 5. Amortiguador Bloqueador TBB: para un 1 L, mezclar 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 de la quinasa IGF-1 (Sugen, Inc.)
 7. Amortiguador TBST: para 1 L, mezclar 6.057 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 10mM en dH₂O.
 10. Amortiguador de Dilución de Quinasa 2X: para 100 mL, mezclar 10 mL de HEPES 1M (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 ATP 4X: para 10 mL, mezclar 0.4 mL de MnCl₂ 1M y 0.008 mL de ATP 0.01 M y 9.56 mL de dH₂O.
 12. Mezcla de Controles Negativos 4X: mezclar 0.4 mL de cloruro de manganeso 1 M en 9.60 mL de dH₂O.

344

13. Placas de polipropileno con fondo en V de 96 pozos NUNC.
14. EDTA 500 mM en dH₂O.
15. Amortiguador de dilución de anticuerpos: para 100 mL, mezclar 10 mL de BSA 5% en PBS, 0.5 mL de leche instantanea no grasa Carnation® al 5% en PBS y 0.1 mL de ortovanadato de sodio 0.1 M en 88.4 mL de TBST.
16. Anticuerpo de antifosfotirosina policlonal conejo, Sugan, Inc.
17. Anticuerpo conjugado HRP anti-conejo de cabra, Biosource.
18. Solución ABTS.
20. ABTS/H₂O₂: mezclar 15 mL de ABTS con 2 µL de H₂O₂ 5 minutos antes de utilizar.
21. 0.2 M HCl en dH₂O.

Procedimiento:

1. recubrir la placa ELISA con 2.0 µg / pozo de Poly(Glu, Tyr) 4:1 (Sigma P0275) en 100 µl de PBS. Almacenar la placa durante la noche a 4° C.
2. lavar la placa una vez con PBS.
3. Agregar 100 µl de Amortiguador Bloqueador TBB a cada pozo. Incubar la placa durante 1 h con agitación a temperatura ambiente.
4. Lavar la placa una vez con PBS, luego dos veces con amortiguador Hepes 50 mM pH 7.5.
5. Agregar 25 µL de compuesto de prueba en DMSO al 4% (obtenido al diluir una solución concentrada de compuesto 10 mM de prueba en DMSO al 100% con dH₂O) a la placa.
6. Agregar 10.0 mg de quinasa gst-IGF-1 en 50 µl de Amortiguador de Dilución de Quinasa) a todos los pozos.
7. Arrancar la reacción de quinase agregando 25µl de mezcla de reacción ATP 4X ATP a todos los pozos de prueba y pozos de control positivo. Agregar 25µl de mezcla de controles negativos 4X a todos los pozos de control negativo. Incubar durante 10 minutos con agitación a temperatura ambiente.

245

8. Agregar 25µl EDTA 0.5 M (pH 8.0) a todos los pozos.
9. Lavar la placa 4x con Amortiguador TBST.
10. Agregar antisuero anti-fosfotirosina policlonal conejo a una dilución de 1:10,000 en 100µl de amortiguador de dilución de anticuerpos a todos los pozos. Incubar con agitación, a temperatura ambiente durante 1 hora.
11. Lavar la placa como en el paso 9.
12. Agregar 100 µL de HRP anti-conejo Biosource a una dilución de 1:10,000 en Amortiguador de dilución de anticuerpos a todos los pozos. Incubar con agitación, a temperatura ambiente durante 1 hora.
13. Lavar la placa como en el paso 9, lavar con PBS para reducir burbujas y Tween-20 de exceso.
14. Desarrollar agregando 100µl/pozo de ABTS/H₂O₂ a cada pozo.
15. Después de 5 minutos aproximadamente, leer sobre un lector ELISA con filtro de prueba a 410 nm y filtro de referencia a 630 nm.

ENSAYOS DE INCORPORACIÓN DE BRDU

Los siguientes ensayos utilizan células diseñadas para expresar un receptor seleccionado y luego evaluar el efecto de un compuesto de interés sobre la actividad de síntesis de ADN inducida por ligandos mediante la determinación de incorporación de BrdU en el ADN.

Los siguientes materiales, reactivos y procedimiento son generales para cada uno de los siguientes ensayos de incorporación de BrdU. Se observan varianzas en ensayos específicos.

Materiales y reactivos:

1. El ligando apropiado.
2. Las células diseñadas apropiadas.
3. Reactivo de Rotulación BrdU: 10 mM, en PBS (pH 7.4)(Boehringer Mannheim, Alemania).

246

4. FixDenat: solución fijadora (lista para utilizar)(Boehringer Mannheim, Alemania).
5. Anti-BrdU-POD: anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con peroxidasa (Boehringer Mannheim, Alemania).
- 5 6. Solución de sustrato TMB: tetrametilbenzidina (TMB, Boehringer Mannheim, Germany).
7. Solución de lavado PBS : PBS 1X, pH 7.4.
8. Albumina Bovina (BSA), polvo en fracción V (Sigma Chemical Co., USA).

10 **Procedimiento general:**

1. Las células son sembradas a 8000 células/pozo en CS al 10%, Gln 2 mM en DMEM, en una placa 96 pozos. Las células son incubadas durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%.
- 15 2. Después de 24 horas, las células son lavadas con PBS, y luego son despojadas de suero en medio libre de suero (CS al 0% en DMEM con BSA al 0.1%) durante 24 horas.
3. El tercer día, 25 µl que contiene ligando (preparado a 1 µg/ml en RPMI con BSA al 0.1%; la concentración HGF final es 200 nG/ml) y los compuestos de prueba son agregados a las células de manera simultánea. Los pozos de control negativo reciben DMEM libre de suero con BSA al 0.1% solamente; las células de control positivo reciben el ligando pero no el compuesto de prueba. Los compuestos de prueba son preparados en DMEM libre de suero con ligando en una placa de 96 pozos, y diluidos de manera serial para 7 concentraciones de prueba.
- 20 4. Después de 18 horas de activación de ligandos, el reactivo de rotulación BrdU diluido (1:100 en DMEM, BSA al 0.1%) es agregado y las células son incubadas con BrdU (concentración final = 10 µM) durante 1.5 horas.
- 25 5. Después de la incubación con reactivo de rotulación, el medio es retirado mediante decantación y tocando la placa invertida sobre papel toalla. Se

347

agrega solución FixDenat (50 µl/pozo) y las plates son incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos sobre un agitador de placa.

6. La solución FixDenat es completamente retirada mediante decantación y tocando la placa invertida sobre papel toalla. Se agrega leche (leche deshidratada al 5% en PBS, 200 µl/pozo) como una solución bloqueador y la placa es incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador de placa.

7. La solución bloqueadora es retirada mediante decantación y los pozos son lavados una vez con PBS. Se agrega solución Anti-BrdU-POD (1:200 dilución en PBS, 1% BSA) (50 µl/pozo) y la placa es incubada durante 90 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador de placa.

8. El conjugado de anticuerpo es completamente retirado mediante decantación y elevando los pozos 5 veces con PBS, y la placa es secada invirtiendo y tocando la placa sobre papel toalla.

9. La solución de sustrato TMB es agregada (100 µl/pozo) e incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador de placa hasta que el desarrollo de color es suficiente para detección fotométrica.

10. La absorbancia de las muestras es medida a 410 nm (en modo de "longitud de onda dual" con una lectura de filtro a 490 nm, como longitud de onda de referencia) sobre un lector de placa ELISA Dynatech.

Ensayo de Incorporación de BrdU EGF-Inducido

Materiales y reactivos:

- 1. EGF de ratón, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japón).
- 2. 3T3/EGFRc7.

Ensayo de Incorporación de BrdU EGF-Inducido y Her-2-impulsado

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).

348

Ensayo de Incorporación de BrdU EGF-inducido y Her-4-impulsado

Materiales y reactivos:

- 5
1. EGF de ratón, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japón).
 2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr (EGFr con un dominio de quinasa Her-4).

Ensayo de Incorporación de BrdU PDGF-inducido

10

Materiales y reactivos:

1. PDGF B/B humano (Boehringer Mannheim, Alemania).
2. 3T3/EGFRc7.

Ensayo de Incorporación de BrdU FGF-inducido

15

Materiales y reactivos:

1. FGF2/bFGF humano (Gibco BRL, USA).
2. 3T3c7/EGFr

Ensayo de Incorporación de BrdU IGF1-inducido

20

Materiales y reactivos:

1. Recombinante Humano, (G511, Promega Corp., USA)
2. 3T3/IGF1r.

Ensayo de Incorporación de BrdU Insulina-inducido

25

Materiales y reactivos:

1. Insulin, crystalline, bovine, Zinc (13007, Gibco BRL, USA).
2. 3T3/H25.

Ensayo de Incorporación de BrdU HGF-inducido

30

349

Materiales y reactivos:

1. HGF Recombinante humano (Catálogo. No. 249-HG, R&D Sistemas, Inc. USA).
2. Células BxPC-3 (ATCC CRL-1687).

5 Procedimiento:

1. Células son sembradas a 9000 células/pozo en RPMI FBS al 10% en una placa de 96 pozos. Las células son incubadas durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%.
2. Después de 24 horas, las células son lavadas con PBS, y luego son despojadas de suero en 100 µl de medio libre de suero (RPMI con BSA al 0.1% BSA) durante 24 horas.
3. El tercer día, se agregan 25 µl de ligando (preparado a 1 µg/ml en RPMI con BSA al 0.1%; concentración final de HGF es 200 ng/ml) y compuestos de prueba a las células. Los pozos de control negativo reciben 25 µl de RPMI libre de suero con BSA al 0.1% solamente; las células de control positivo reciben el ligando (HGF) pero no el compuesto de prueba. Los compuestos de prueba son preparados a 5 veces su concentración final en RPMI libre de suero con ligando en una placa de 96 pozos, y serialmente diluidos para proporcionar 7 concentraciones de prueba. Típicamente la concentración final más alta del compuesto de prueba es 100 µM, y se utilizan diluciones 1:3 (es decir, el rango de concentración final del compuesto de prueba es 0.137-100 µM).
4. Después de 18 horas de activación de ligandos, 12.5 µl de reactivo de rotulación BrdU diluido (1:100 en RPMI, BSA al 0.1%) es agregado a cada pozo y las células son incubadas con BrdU (la concentración final es 10 µM) durante 1 hora.
5. Igual que el procedimiento general.
6. Igual que el procedimiento general.

350

- 7. La solución bloqueadora es retirada mediante decantación y los pozos son lavados una vez con PBS. Solución anti-BrdU-POD (dilución 1:100 en PBS, BSA al 1%) es agregada (100 µl/pozo) y la placa es incubada durante 90 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador de placa.
- 8. Igual que Procedimiento general.
- 9. Igual que Procedimiento general.
- 10. Igual que Procedimiento general.

Ensayo-HUV-EC-C

Este ensayo se utiliza para medir la actividad de un compuesto contra PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF o Flk-1/KDR, todas estas naturalmente expresadas mediante células HUV-EC.

DIA 0

1. Lavar y tripsinizar las células HUV-EC-C (células endoteliales de vena umbilical humana, (colección de cultivos tipo americano), catálogo No 1730 CRL). Lavar con solución salina amortiguada por fosfato de Dulbecco (D-PBS, obtenida en Gibco BRL, un catálogo de número 14190-029) dos veces a 1 ml/10 cm² aproximadamente de matraz de cultivo de tejidos. Tripsiniza con EDTA-tripsina al 0.05% en solución de disociación celular no-enzimática (Sigma Chemical Company, catálogo no. C-1544) La tripsina al 0.05% es preparada mediante dilución de tripsina al 0.25%/EDTA 1 mM (Gibco, catálogo No. 25200-049) en la solución de disociación celular. La tripsiniza con aproximadamente 1 ml/25-30 cm² de matraz de cultivo de tejido duante aproximadamente 5 minutos a 37°C. Después de que las células son separadas de la matraz, agregar un volumen igual de medio de ensayo y transferir a un tubo de centrifuga estéril de 50 ml (Fisher Scientific, catálogo No. 0.5-539-6).

2. Lavar las células con aproximadamente 35 ml de medio de ensayo en el tubo de centrifuga estéril de 50 ml agregando el medio de ensayo, centrifugar durante 10

351

minutos aproximadamente 200x g, aspirar el sobrenadante, y resuspender con 35 ml de D-PBS. Repetir el lavado dos veces más con D-PBS, resuspender las células en aproximadamente 1 ml de medio de ensayo/15 cm² de matraz de cultivo de tejidos. El medio de ensayo consta de medio F12K (Gibco BRL, catálogo No. 21127-014) y suero bovino fetal inactivado por calor al 0.5%. Contar las células con un contador Counter (Counter Electronics, Inc.) y agregar el medio de ensayo a las células para obtener una concentración de 0.8-1.0 x 10⁵ células/ml.

3. Agregar las células a placas de fondo plano de 96 pozos a 100 ul/pozo o 0.8-1.0 x 10⁴ células/pozo, incubar 24h a 37°C, Co₂ al 5%.

DIA 1

1. Completar titulaciones dobles de compuestos de prueba en placas de 96 pozos separadas, generalmente 50 uM on down utilizar el mismo medio de ensayo mencionado para el día 0, paso 2 anterior. Las titulaciones son hechas agregando 90 ul/pozo de compuesto de prueba a 200 uM (la concentración final de pozo) a la parte superior del pozo de una columna de placa particular. Puesto que el compuesto de prueba concentrado es usualmente 20 mM en DMSO, la concentración de fármaco 200 uM contiene DMSO del 2%.

Un diluyente llevado a DMSO al 2% en medio de ensayo (F12K + suero bovino fetal al 0.5%) es utilizado como diluyente para las titulaciones de compuesto de prueba con el objeto de diluir el compuesto de prueba pero mantener la concentración de DMSO constante. Agregar este diluyente a los pozos restantes en la columna a 60 ul/pozo. Tomar 60 ul de los 120 ul de dilución de compuesto de prueba de 200 uM en el pozo superior de la columna y mezclar con 60 ul en el segundo pozo de la columna. Tomar 60 ul de este pozo y mezclar con los 60 ul en el tercer pozo de la columna, y así sucesivamente hasta completar titulaciones dobles. Cuando el pozo siguiente al último es mezclado, tomar 60 ul de los 120 ul en este

32

pozo y descartarlo. Dejar el último pozo con 60 ul de DMSO/diluyente de medio como un control no de prueba que contenga el compuesto. Preparar 9 columnas de compuesto de prueba titrado, suficiente para pozos en triplicado cada uno para: (1) VEGF (obtenido en Pepro Tech Inc., catálogo No. 100-200, (2) factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) (también conocido como factor de crecimiento de fibroblastos ácidos, o aFGC) (obtenido en Boehringer Mannheim Biochemica, catálogo No. 1439 600), o (3) PDGF B/B humano (1276-956 Boehringer Mannheim, Alemania) y control de medio de ensayo. ECGF viene como una preparación con heparina de sodio.

2. Transferir 50 ul/pozo de diluciones del compuesto de prueba a las placas de ensayo de 96 pozos conteniendo $0.8-1.0 \times 10^4$ células/100 ul/pozo de las células HUV-EC-C del día 0 e incubar 2 horas a 37°C, CO₂ al 5%.

3. En triplicado, agregar 50 ul/pozo de 80 ug/ml de VEGF, 20 ng/ml de ECGF, o control de medio a cada condición del compuesto de prueba. Como con los compuesto de prueba, las concentraciones de factor de crecimiento son 4X la concentración final deseada. Utilizar el medio de ensayo del día 0 paso 2 para preparar las concentraciones del factor de crecimiento. Incubar aproximadamente 24 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Cada pozo tendrá 50 ul de dilución del compuesto de prueba, 50 ul de medio o factor de crecimiento, y 100 ul de células, el cual se calcula hasta un total de 200 ul/pozo. Por lo tanto, las concentraciones 4X del compuesto de prueba y los factores de crecimiento se vuelven 1X una vez que todo ha sido agregado a los pozos.

DIA 2

1. Agregar ³H-timidina (Amersham, catálogo No. TRK-686) a 1 uCi/pozo (10 ul/pozo en solución de 100 uCi/ml hecho en medio RPMI + suero bovino fetal

353

inactivado por calor) e incubar duante 24 h a 37°C, CO2 al 5%. RPMI es obtenido en Gibco BRL, catálogo No. 11875-051.

DIA 3

5

1. Congelar las placas durante la noche a -20°C

DIA 4

10

Descongelar las placas y cosechar con un cosechador de placas de 96 pozos (Tomtec Harvester 96) sobre almohadillas de filtro (Wallac, catálogo No. 1205-401) leer los totales sobre un contador del centelleo líquido Wallac Betaplate.

15

La TABLA 2 muestra los resultados de las pruebas biológicas de algunos compuestos de ejemplo de la fórmula (I). Los resultados son reportados en términos de IC50, la concentración micromolar (µM) del compuesto probado que produce un cambio de 50% en la actividad de la PTK objetivo en comparación con la actividad de la PTK en un control al cual no se agregó compuesto de prueba.

20

Específicamente, los resultados mostrados indican la concentración de un compuesto de prueba necesario para producir una reducción del 50% de la actividad de la PTK objetivo. Los bioensayos que se han utilizado o se pueden utilizar para evaluar los compuestos son descritos en detalle a continuación.

TABLA 2

Ejemplo	bio flkGST IC50 (µM)	bio FGFR1 IC50 (µM)	bio PDGF IC50 (µM)	bio EGF IC50 (µM)	cell EGF IC50 (µM)	Her2 Quinas a IC50 (µM)	cdk2spa C50 (µM)	bio pyk2 IC50 (µM)
1	57.68	15.16	>100	>100	>100			>100

Ejemplo	bio flkGST IC50 (μM)	bio FGFR1 IC50 (μM)	bio PDGF IC50 (μM)	bio EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Quinas a IC50 (μM)	cdk2spa C50 (μM)	bio pyk2 IC50 (μM)
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	20.08	5.5		
9	0.96		>100	>100	>100	16.38		
10	5.72		>100	94.04	15.86	8.06		
11	9.77		>100	>100	>100	>100		
12	>20		21.46	>100		27.73		
13	>20		81.92	8.17		2.66		
14	13.01		42.41	>100		66.02		
15	>20		>100	>100		98.61		
16	>20		98.06	>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		
21	7.18		>100	40.34		27.69		
22	>20		>100	>100		87.67		
23	>20		>100	36.64		4.05		
24			>100	16.84		5.31		
25	12.55		>100	23.48		7.9		
26	16.03		66.87	34.67		10.04		

35

Ejemplo	bio flkGST IC50 (μM)	bio FGFR1 IC50 (μM)	bio PDGF IC50 (μM)	bio EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Quinas a IC50 (μM)	cdk2spa C50 (μM)	bio pyk2 IC50 (μM)
27			>100	26.5		3.91		
28	4.5		71.27	53.66		2.67		
29	10.12		>100	26.72		3.98		
30	9.4		>100	18.69		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		
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		
44	<0.05		0.02	20.73	67.46	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	0.006	0.3	<0.78	17.88	21.58	7.93		0.09
49			<0.78	>100	43.86	>100		
50			<0.78	>100	20.34	>100		
51	0.006	1.66	0.01	18.1	21.61	23.24	16.69	0.35
52	0.08	1.26	<0.78	12.53	>100	>100	10.66	0.45
53			<0.78	>100	>100	>100		

756

Ejemplo	bio flkGST IC50 (μM)	bio FGFR1 IC50 (μM)	bio PDGF IC50 (μM)	bio EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Quinas a IC50 (μM)	cdk2spa C50 (μM)	bio pyk2 IC50 (μM)
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		
65	0.37		<0.05	>100	74.36	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		

357

Ejemplo	bio flkGST IC50 (μM)	bio FGFR1 IC50 (μM)	bio PDGF IC50 (μM)	blo EGF IC50 (μM)	cell EGF IC50 (μM)	Her2 Quinas a IC50 (μM)	cdk2spa C50 (μM)	bio pyk2 IC50 (μM)
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		0.008
84	1.38		12.51	67.2		5.86		0.006
85	0.2	0.8	2.59	>100		3.76		
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*

5

MODELOS ANIMALES DE XENOINJERTO

La capacidad de los de los tumores humanos para crecer como xenoinjertos en ratones atímicos (*ej.*, Balb/c, nu/nu) proporciona un modelo in vivo útil para estudiar la respuesta biológica a terapias para tumores humanos. Desde el primer xenotransplante exitoso de tumores humanos en ratones atímicos,(Rygaard y Povlsen, 1969, Acta Pathol.

10

356

Microbial. Scand. 77:758-760), muchas líneas celulares de tumores humanos diferentes (ej., mamaria, pulmonar, genitourinaria, gastrointestinal, de cabeza y cuello, glioblastoma, ósea, y de melanomas malignos) han sido trasplantadas y exitosamente cultivadas en ratones desnudos. Los siguientes ensayos se pueden utilizar para determinar el nivel de actividad, especificidad y el efecto de los diferentes compuestos de Fórmula (I).

Tres tipos generales de ensayos son útiles para evaluar los compuestos de Fórmula (I): celular/catalítico, celular/biológico e *in vivo*. El objetivo de los ensayos celulares/catalíticos es determinar el efecto de un compuesto sobre la capacidad de una TK para fosforilar tirosina sobre un sustrato conocido en una célula. El objetivo de los ensayos celulares/biológicos es determinar el efecto de un compuesto sobre la respuesta biológica estimulada por una TK en una célula. El objetivo de los ensayos *in vivo* es determinar el efecto de un compuesto de Fórmula (I) en un modelo animal de un trastorno particular como el cáncer.

Líneas celulares apropiadas para experimentos de xenoinjerto subcutáneo incluyen células C6 (glioma, ATCC # CCL 107), células A375 (melanona, ATCC # CRL 1555), células Calu 6 (pulmón, ATCC # HTB 56), células PC3 (próstata, ATCC # CRL 1435), células SKOV3TP5 y fibroblastos NIH 3T3 genéticamente diseñados para sobreexpresar EGFR, PDGFR, IGF-1R o cualquier otra quinasa de prueba. El siguiente protocolo se puede utilizar para realizar experimentos de xenoinjerto:

Ratones atímicos hembra (BALB/c, nu/nu) son obtenidos en los Laboratorios Simonsen (Gilroy, CA). Todos animales son mantenidos bajo condiciones higiénicas en jaulas Micro-aislantes con lechos Alfa-dri. Éstos reciben comida estéril para roedores y agua a discreción.

Las líneas celulares son cultivadas en medio apropiado (por ejemplo, MEM, DMEM, Ham's F10, o Ham's F12 más suero bovino fetal al 5% - 10% (FBS) y glutamina 2 mM (GLN)). Todos los medios de cultivo celular, la vitamina y suero bovino fetal son obtenidos en Gibco Life Technologies (Grand Island, NY) a menos que se especifique lo contrario. Todas las células son cultivadas en una atmósfera húmeda de 90-96% aire y 5-10% CO₂ a 37°C. todas las líneas celulares son rutinariamente subcultivadas dos veces por

509

semana y son negativas para micoplasma tal como se determinó mediante el método Mycotect (Gibco).

Las células son cosechadas en confluencia o en confluencia próxima con Tripsina-EDTA al 5% y peletizadas a 450 x g durante 10 minutos. Los pellets son resuspendidos en PBS estéril o medio (sin FBS) hasta una concentración particular y las células son implantadas en el costado trasero de los ratones (8-10 ratones por grupo, $2 \cdot 10^6$ células/animal). El crecimiento tumoral es medido durante tres a seis semanas utilizando calibradores Venier. Los volúmenes tumorales son calculados como un producto de longitud x anchura x altura a menos que se indique lo contrario. Los valores P son calculados utilizando la prueba-t de Student. Los compuestos de prueba en 50 -100 uL de excipiente (DMSO), VPD:D5W) se pueden liberar mediante inyección IP diferentes concentraciones comenzando generalmente un día después del implante..

MODELO DE INVASIÓN TUMORAL

El siguiente modelo de invasión tumoral ha sido desarrollado y se puede utilizar para la evaluación del valor terapéutico y eficiencia de los compuestos identificados que inhiben selectivamente el receptor KDR/FLK-1.

Procedimiento

Ratones desnudos de ocho semanas de edad (hembra) (Simonsen Inc.) son utilizados como animales experimentales. El implante de células tumorales se puede realizar en una cubierta de flujo laminar. Para anestesia, se administra un cóctel de xilazina/cetamina (100 mg/kg de cetamina y 5 mg/kg de xilazina) de manera intraperitoneal. Una incisión de línea media es hecha para exponer la cavidad abdominal (aproximadamente 1.5 cm de longitud) para inyectar 10^7 células tumorales en un volumen de 100 ul de medio. Las células son inyectadas en el lóbulo duodenal del páncreas o bajo la serosa del colon. El peritoneo y los músculos son cerrados con una sutura continua de seda 6-0 y la piel es cerrada utilizando clips para heridas. Los animales son observados diariamente.

260

Análisis

Después de 2-6 semanas, dependiendo de las observaciones generales de los animales, los ratones son sacrificados, y las metástasis tumorales locales hacia varios órganos (pulmón, hígado, cerebro, bazo, estómago, corazón, músculos) son extirpadas y
5 analizadas (medición del tamaño del tumor, grado de invasión, inmunohistoquímica, determinación de hibridización *in situ*. etc).

ENSAYO c-KIT

Este ensayo se utiliza para detectar el nivel de fosforilación de tirosina c-kit.

10 Las células MO7E (leucemia mieloide aguda humana) son despojadas de suero durante la noche en suero al 0.1%. Las células son pre-tratadas con el compuesto de Fórmula (I) (concurrente con despojo de suero), antes de estimulación con ligandos. Las células son estimuladas con 250 ng/ml de rh-SCF durante 15 minutos. Después de la estimulación, las células fueron sometidas a lisis e inmunoprecipitadas con un anticuerpo
15 anti-c-kit. Los niveles de fosfotirosina y proteína fueron determinados mediante Western Blotting.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MTT

Las células MO7E son despojadas de suero y pre-tratadas con un compuesto de la
20 Fórmula (I) como aquel descrito para los experimentos de fosforilación. Las células son sembradas 4×10^5 células/pozo en un plato de 96 pozos, en 100 μ l de RPMI + suero al 10%. Se agrega rh-SCF (100 ng/mL) y la placa es incubada durante 48 horas. Después de 48 horas, se agrega 10 μ l de 5mg/ml de MTT (bromuro de 3-(4,-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y se deja incubar durante cuatro horas. Se agrega isopropanol ácido (100
25 μ l de 0.04N de HCl en isopropanol) y la densidad óptica se mide a una longitud de onda de 550 nm.

ENSAYO DE APOPTOSIS

Las células MO7E son incubadas a +/- SCF y +/- compuesto de la Fórmula (I) en
30 FBS al 10% con rh-GM-CSF (10 ng/mL) y rh-IL-3 (10 ng/mL). Las muestras fueron

361

evaluadas a las 24 y a las 48 horas. Para medir la caspasa-3 activada, las muestras son lavadas con PBS y permeabilizadas con etanol helado al 70%. Las células son luego teñidas con anticuerpo policlonal de conejo PE-conjugado anti-activo caspasa-3 y analizadas mediante FACS. Para medir PARP adherida, las muestras son sometidas a lisis y analizadas mediante western blotting con un anticuerpo anti-PARP.

Ensayos Adicionales

Los ensayos adicionales que se pueden utilizar para evaluar los compuestos de este invento incluyen, sin limitación, un ensayo bio-flk, un ensayo de receptores EGF-HER quiméricos en células completas, un ensayo bio-src, un ensayo bio-lck y un ensayo que mide la función de la fosforilación de raf. Los protocolos para cada uno de estos ensayos se pueden encontrar en la Solicitud No. 09/099.842, la cual es incorporada en la presente como referencia, incluyendo cualquier ilustración.

15 Medición de Toxicidad Celular

Los compuestos terapéuticos deben ser más potentes en inhibir la actividad de la tirosinquinasa receptora que en ejercer un efecto citotóxico. Una medida de la efectividad y toxicidad celular de un compuesto se puede obtener al determinar el índice terapéutico, es decir, IC_{50}/LD_{50} . El IC_{50} , la dosis requerida para lograr una inhibición del 50%, se puede medir utilizando técnicas estándares tales como aquellas descritas en la presente. El LD_{50} , o la dosis que resulta en una toxicidad del 50%, también se puede medir mediante técnicas estándares (Mossman, 1983, *J. Immunol. Methods*, 65:55-63), midiendo 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. Se prefieren compuestos con un índice terapéutico grande. El índice terapéutico debe ser mayor que 2, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente, por lo menos 50.

B. Ejemplo de Resultados de Ensayos Celulares Utilizando (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80).

Para confirmar la potencia de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) detectada en ensayos bioquímicos (*véase abajo*), la capacidad de dicho compuesto para inhibir la fosforilación de RTK ligando- dependiente fue evaluada en ensayos basados en células utilizando células de ratón NIH-3T3 diseñadas para sobreexpresar Flk-1 o PDGFR β . (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) inhibió la fosforilación de la Flk-1 tirosina VEGF- dependiente con un valor de IC₅₀ de aproximadamente 0.03 μ M. Este valor es similar al valor de Ki 0.009 μ M determinado para la inhibición de Flk-1 mediante (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) determinado en ensayos bioquímicos. Esto indica que (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) fácilmente penetra en las células. Consistente con los datos bioquímicos (*véase abajo*) indicando que (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) tuvo actividad comparable contra Flk-1 y PDGFR β , también se encontró que inhibió la fosforilación de receptores dependiente de PDGF en células con un valor IC₅₀ de aproximadamente 0.03 μ M. La capacidad de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) para inhibir c-kit, una RTK estrechamente relacionada que fija el factor celular troncal (SCF), fue determinada utilizando células MO7E que expresan este receptor. En estas células, (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) inhibió la fosforilación c-kit dependiente de SCF con un valor IC₅₀ de 0.01-0.1 μ M. Este compuesto también inhibió la fosforilación de c-kit estimulada por SCF en blastos de leucemia mieloide aguda aislados a partir de sangre periférica de pacientes.

363

Además de probar la capacidad de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) para inhibir la fosforilación ligando-dependiente de receptores en las células, su efecto sobre la respuesta proliferativa ligando- dependiente de células también fue examinada *in vitro* (ver Tabla 4). En estos estudios, las células inactivadas por falta de suero durante la noche fueron inducidas a realizar síntesis de ADN al adicionar el ligando mitogénico apropiado. Como se muestra en la Tabla 3, (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) inhibió la proliferación inducida por PDGF de células NIH-3T3 sobreexpresando PDGFRβ o PDGFRα con valores IC₅₀ de 0.031 y 0.069 μM, respectivamente, y la proliferación inducida por SCF de células MO7E con un valor IC₅₀ de 0.007 μM.

TABLA 3

	Bioquímico	IC ₅₀ Celular	
Receptor	K _i ¹ (μM)	Fosforilación de Receptores (μM)	Proliferación Ligando- Dependiente (μM)
Flk-1/KDR	0.009	0.03 ²	0.004 ³
PDGFRα	0.008	0.03 ⁴	0.031 ⁴
PDGFRβ	ND	ND	0.069 ⁵
FGFR	0.83	ND	0.7 ³
c-kit	ND	0.01-0.1 ⁶	0.007 ⁶
ND = No Determinado			
¹ Determinado utilizando enzima recombinante			
² Determinado utilizando células NIH-3T3 despojadas de suero que expresan flk-1			
³ Determinado utilizando HUVECs despojadas de suero			
⁴ Determinado utilizando células NIH-3T3 despojadas de suero que expresan PDGFR□			
⁵ Determinado utilizando células NIH-3T3 que expresan PDGFR□			
⁶ Determinado utilizando células MO7E despojadas de suero			

364

Como se muestra en la Tabla 3, existe un acuerdo general entre las actividades bioquímicas y celulares de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) soportando la conclusión que este compuesto cruza las membranas celulares. Además, se pudo concluir que las respuestas celulares son un resultado de la actividad del compuesto 80 contra el objetivo indicado. En contraste, cuando se probó en presencia de medio de crecimiento completo *in vitro*, concentraciones sustancialmente mayores de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) (>10 µM) fueron requeridas para inhibir el crecimiento de una variedad de células tumorales humanas (ver Tabla 4). Esto indica que el compuesto no inhibió directamente el crecimiento de estas células en concentraciones requeridas para inhibir la fosforilación de receptores ligando- dependiente y la proliferación celular.

TABLA 4

Línea celular	Origen	IC ₅₀ (µM)	LD ₅₀ (µM)
HT29	Carcinoma de colon	10	22
A549	Carcinoma Pulmonar	9.5	22
NCI-H460	Carcinoma pulmonar NSC	8.9	20
SF767T	Glioma	7.9	14
A431	Carcinoma Epidermoide	6.0	18

Brevemente, los resultados mostrados en la Tabla 4 fueron obtenidos al incubar células durante 48 horas en medio de crecimiento completo en presencia de diluciones seriales de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-

363

ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico. Al final del periodo de crecimiento, el número relativo de células fue determinado. Los valores IC₅₀ fueron calculados como la concentración del compuesto que inhibió el crecimiento de las células en un 50% con relación a las células no tratadas. Los valores LD50 fueron calculados como la

5 concentración del compuesto que produjo una reducción del 50% en el número de células con relación al número de células al comenzar el experimento.

Un ensayo más relevante con base celular el cual evalúa el potencial anti-angiogénico de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) es el ensayo de

10 mitogénesis *in vitro* que utiliza células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) como un sistema modelo para la proliferación de células endoteliales crítico para el proceso angiogénico. En este ensayo, una respuesta mitogénica, medida como un aumento en síntesis de ADN, es inducida en HUVECs despojadas de suero al agregar VEGF o FGF. En estas células, (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-
15 ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) inhibió la respuesta mitogénica inducida por VEGF y FGF en una forma dosis- dependiente con valores IC₅₀ de 0.004 µM y 0.7 µM, respectivamente, cuando el compuesto estuvo presente en el ensayo de 48 horas.

Brevemente, los resultados antes mencionados fueron obtenidos utilizando
20 HUVECs despojadas de suero que fueron incubadas con concentraciones mitogénicas de VEGF (100 nG/ml) o (30 ng/ml) en la presencia de diluciones seriales de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) durante 24 horas. La respuesta mitogénica durante las siguientes 24 horas en presencia de ligando e inhibidor fue cuantificada mediante la
25 medición de síntesis de ADN con base en la incorporación de bromodesoxiuridina en ADN celular.

En experimentos separados, el compuesto 80 inhibió la fosforilación VEGF- dependiente de ERK ½(p42/44MAP quinasa), un objetivo temprano corriente abajo de Flk-1/KDR, en una forma dosis- dependiente. La actividad inhibitoria del compuesto 80
30 también demostró ser de larga duración en este sistema; inhibiendo la fosforilación VEGF-

366

dependiente de ERK $\frac{1}{2}$ por hasta 48 horas después de la remoción de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) del medio después de una corta exposición (2 hr) a concentraciones micromolares del compuesto.

5 VEGF ha sido reconocido como un factor de supervivencia importante para células endoteliales. Puesto que (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) inhibe la respuesta mitogénica VEGF- dependiente de HUVECs, se investigó el efecto del compuesto sobre la supervivencia de HUVECs. En estos experimentos, la escisión del
10 sustrato de caspasa 3 poli-ADP-ribosil polimerasa (PARP) fue utilizada como una lectura para apoptosis. Las HUVECs cultivadas en condiciones despojadas de suero durante 24 horas exhibieron niveles sustanciales de escisión PARP, como se detectó mediante la acumulación del fragmento de depuración PARP de 23 kDa. Esto se evitó ampliamente mediante la adición de VEGF al medio celular, indicando que VEGF actúa como un factor
15 de supervivencia en este ensayo. Se ha mostrado que (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) inhibe la señalización KDR. Por consiguiente, (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) inhibió la supervivencia de HUVECs mediada por VEGF en una forma
20 dosis- dependiente. Por lo tanto, estos datos indican que el compuesto 80 indujo apoptosis en células endoteliales en cultivo en presencia de VEGF.

C. Estudios de Eficacia *in vivo*

i. Eficacia contra xenoinjertos tumorales establecidos

25 La eficacia *in vivo* de (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) fue estudiada en modelos de xenoinjertos subcutáneos (SC) utilizando células tumorales humanas implantadas en la región trasera de ratones atímicos. Después del implante, los tumores se dejaron establecer a un tamaño de 100-550 mm³ antes de comenzar el
30 tratamiento oral con el compuesto.

362

La administración oral diaria del compuesto 80 produjo una inhibición dosis-dependiente del crecimiento tumoral A431 cuando el tratamiento fue iniciado después de que los tumores habían crecido hasta un tamaño de 400 mm³. Se observó una inhibición de crecimiento tumoral estadísticamente significativa (P <0.05) en dosis de 40 mg/kg/día (inhibición del 74%) y 80 mg/kg/día (inhibición del 84%) (ver Tabla 6). En experimentos preliminares, una dosis mayor (160 mg/kg/día) del compuesto no fue más eficaz contra los tumores A431 establecidos en comparación con la dosis de 80 mg/kg/día. Además, los ratones tratados con la dosis 160 mg/kg/día del compuesto perdieron peso corporal, indicando que la dosis mayor no fue bien tolerada. Resultados similares fueron obtenidos en un experimento en el cual los tumores A431 fueron solamente dejados alcanzar 100 mm³ de tamaño (ver Tabla 4). En este segundo experimento, la regresión completa de los tumores ocurrió en seis de los ocho animales tratados con la dosis de 80 mg/kg/día durante 21 días. En estos seis animales, los tumores no crecieron nuevamente durante el periodo de observación de 110 días después de finalizar el tratamiento. En los dos animales en los cuales los tumores crecieron nuevamente hasta un tamaño grande (2000-3000 mm³), los tumores retrocedieron en respuesta a una segunda ronda de tratamiento con el compuesto 80. De manera importante, en todos los experimentos de eficacia, la (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) en dosis de 80 mg/kg/día ha sido bien tolerada, aún cuando se administró continuamente durante más de 100 días.

TABLA 5

Volumen Tumoral 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

368

100	80	93 (40)	0.002
	40	75 (40)	0.015
	10	61 (40)	0.059
¹ Compuesto 80.			

Brevemente, los resultados mostrados en la Tabla 5 fueron obtenidos utilizando células A431 (0.5 x 10⁶ células/ratón) las cuales fueron implantadas de manera subcutánea en la región trasera de ratones atímicos. La administración oral diaria de (2-dietilamino-
5 etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) en vehículo con base en Cremofor o un vehículo control comenzó cuando los tumores alcanzaron el volumen promedio indicado. Los tumores fueron medidos utilizando calibradores vernier y el volumen tumoral fue calculado como el producto de la longitud x ancho x altura. Los valores P fueron calculados al
10 comparar el tamaño de los tumores para animales que fueron tratados con el compuesto 80 (n=8) con aquellos animales que fueron tratados con un vehículo (n=16) en el último día del experimento, utilizando la prueba t de Student de doble cola.

La eficacia del compuesto 80 contra los tumores humanos establecidos de diferentes orígenes fue determinada utilizando xenoinjertos de Colo205 (carcinoma de colon),
15 SF763T (glioma), y NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células no pequeñas) (ver tabla 6). Estos experimentos fueron conducidos utilizando (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) administrado de manera oral a 80 mg/kg/día; una dosis que fue efectiva y bien tolerada.

20

TABLA 6

369.

	Tipo de Tumor	Volumen Tumoral 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 al experimento reportado en la Tabla 5.				

En los experimentos antes mencionados, el compuesto 80 fue administrado una vez al día a 80 mg/kg en un vehículo basado en Cremofor una vez los tumores alcanzaron el tamaño indicado. El porcentaje de inhibición comparado con el grupo de control tratado con el vehículo fue calculado al finalizar los experimentos. Los valores P fueron calculados al comparar los tamaños de tumores de animales que habían sido tratados con el compuesto con los tamaños de tumores de aquellos animales que habían sido tratados con el vehículo, utilizando la prueba t de Student de doble cola.

Aunque (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80) inhibió el crecimiento de todos los tipos de tumores mostrados en la Tabla 7, hubo una diferencia en la respuesta de los diferentes modelos de xenoinjerto. Específicamente, el crecimiento de tumores NCI-H460 y SF763T fue detenido o altamente retardado mientras que los tumores Colo205, como los tumores A431, retrocedieron cuando fueron tratados con (2-dietilamino-etil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (compuesto 80).

Con el objeto de determinar la base molecular para la diferencia en respuesta entre modelos de xenoinjerto, se estudiaron los tumores SF763T. Por lo tanto, los tumores SF763T, los cuales respondieron menos al tratamiento con (2-dietilamino-etil)amida del

370

ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico, han sido evaluados a nivel molecular utilizando técnicas inmunohistológicas para determinar el efecto del tratamiento con el compuesto. Estos estudios fueron inicialmente realizados en este tipo de tumor puesto que los tumores SF763T son altamente vascularizados con microvasos que expresan fuertemente el marcador celular endotelial CD31 y por lo tanto son apropiados para estudios de densidad de microvasos tumorales (MVD). La evaluación inmunohistológica de los tumores SF763T indicó que los tumores de animales tratados tuvieron MVD reducida en relación con los controles tratados con vehículos, consistente con un mecanismo anti-angiogénico de acción para el compuesto 80; MVD fue 24.2 ± 4.1 en animales tratados con el compuesto 80, en comparación con 39.3 ± 5.7 para aquellos que fueron tratados únicamente con el vehículo. Como se anticipó a partir de la detención asociada del crecimiento tumoral, fue evidente una proliferación celular tumoral en tumores que fueron tratados con el compuesto 80. Estos tumores tuvieron la mitad del índice mitótico en comparación con aquellos tumores tratados con vehículos (no se muestran datos). El efecto del compuesto 80 sobre MVD y proliferación celular tumoral indica que el compuesto tiene profundos efectos anti-angiogénicos y anti-tumorales, aún bajo condiciones en las cuales los tumores no retrocedieron.

La capacidad del compuesto 80 para inhibir fosforilación PDGFR y señalización subsiguiente *in vivo* también fue evaluada en los tumores SF763T, los cuales expresan altos niveles de PDGFR β . El tratamiento de los tumores SF763T con el compuesto 80 inhibió fuertemente la fosforilación de la PDGFR β tirosina en los tumores SF763 establecidos. El compuesto 80 también redujo los niveles de la fosfolipasa C gama fosforilada (activada) (PLC- γ), un indicador corriente abajo inmediato de la activación de PDGFR. Estos datos demuestran que la administración oral del compuesto 80 produce un efecto directo sobre la actividad objetivo (PDGFR) en tumores *in vivo*.

Con base en la demostración que la capacidad del compuesto 80 en inhibir la señalización dependiente de VEGF en HUVECs *in vitro* fue de larga duración (*vide supra*), la eficacia del compuesto fue evaluada cuando el compuesto fue administrado de manera no frecuente en el modelo tumoral Colo205. Como se muestra en la Tabla 7, 80 mg/kg (inhibición del 91%) y 40 mg/kg (inhibición del 84%) fueron eficaces cuando se

371

administraron diariamente, pero no cuando se administraron dos veces por semana. En contraste, una dosis mayor del compuesto 80 (160 mg/kg) inhibió (inhibición del 52%) el crecimiento de tumores Colo205 establecidos cuando se administró dos veces por semana, indicando que este compuesto puede demostrar eficacia cuando se administra de manera no frecuente a una dosis mayor. Se debe notar que los regímenes de dosificación se pueden determinar por aquellos con experiencia en el estado de la técnica sin experimentación indebida.

TABLA 7

Dosis (mg/kg)	Frecuencia	% Inhibición	Valor-P
160	Dos veces a la semana	52	0.085
	Una vez a la semana	17	NS
80	Todos los días	91	0.039
	Dos veces a la semana	19	NS
	Una vez a la semana	0	NS
40	Todos los días	84	0.028
	Dos veces a la semana	36	NS
NS: no significativo (P >0.05)			

Brevemente, los resultados en la Tabla 7 fueron obtenidos utilizando las células Colo205 (0.5 x 10⁶/ratón) que habían sido implantadas subcutáneamente en la región trasera de ratones atímicos. La administración oral del compuesto 80 según el programa indicado comenzó cuando los tumores alcanzaron 400 mm³. Los tumores fueron medidos

372

utilizando calibradores vernier y el volumen tumoral fue calculado como el producto de longitud x ancho x altura. Los valores P fueron calculados al comparar el tamaño de los tumores para animales que fueron tratados con el compuesto 80 con aquellos animales que fueron tratados con un vehículo en el último día del experimento, utilizando la prueba t de Student.

ii. Eficacia del Compuesto 80 en un Modelo de Enfermedad Diseminada

Además de soportar el crecimiento sostenido de tumores primarios sólidos, la angiogénesis también es un componente esencial que apoya el desarrollo de una enfermedad diseminada debido a una metástasis a partir del tumor primario. El efecto del compuesto 80 sobre el desarrollo de una enfermedad diseminada fue examinado en el modelo de colonización pulmonar de melanoma de ratón B16-F1. En este modelo, las células B16-F1 inoculadas intravenosamente a través de la vena de la cola de ratones colonizan los pulmones y forman tumores. Como se muestra en la Tabla 7, la administración oral del compuesto 80 a 80 mg/kg/día redujo efectivamente el peso de las células B16-F1 en el pulmón como se evaluó mediante las mediciones de peso pulmonar total. Estos datos indican que el compuesto 80 puede inhibir la enfermedad diseminada *in vivo*.

TABLA 8

	<u>Peso Pulmonar (g)</u>	<u>% Inhibición</u>	<u>Valor-P</u>
<u>Vehículo</u>	<u>0.83 ± 0.07</u>	=	=
<u>Compuesto¹</u>	<u>0.41 ± 0.04</u>	50	<0.001
¹ Compuesto 80			

Brevemente, los resultados mostrados en la Tabla 8 fueron obtenidos utilizando ratones atímicos que habían sido inoculados con células tumorales B16-F1 (5x10⁵ células/ratón) a través de la vena de la cola. Los ratones fueron tratados diariamente con el

323

compuesto 80 administrado de manera oral a 80 mg/kg/día (n=10) o vehículo (n=18) durante 24 días después de inoculación celular tumoral. Al final del periodo de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y sus pulmones retirados y pesados. El porcentaje de inhibición fue calculado al comparar el peso de pulmones de aquellos animales que habían sido tratados con el compuesto 80, con el peso de pulmones de los animales que habían sido tratados solamente con el vehículo. Los valores P fueron determinados utilizando la prueba t de Student de doble cola.

II. Inhibidores de la Cox-2

La capacidad de los inhibidores de la cox-2 para retardar el crecimiento de tumores fue probada utilizando el Modelo Pulmonar de Lewis descrito a continuación.

Los ratones fueron inyectados subcutáneamente en la pata izquierda (1×10^6 células tumorales suspendidas en Matrigel al 30%) y el volumen tumoral fue evaluado utilizando un fletismómetro dos veces por semana durante 30-60 días. Se obtuvo sangre dos veces durante el experimento en un protocolo de 24 horas para acceder a la concentración de plasma y la exposición total mediante análisis AUC. Los datos son expresados como la media $\pm$ SEM. Las pruebas de Student y Mann-Whitney fueron utilizadas para evaluar las diferencias entre las medias utilizando el software InStat. El celecoxib proporcionado en la dieta a dosis entre 160-3200 ppm retardó el crecimiento de estos tumores. El efecto inhibitorio del celecoxib fue dosis- dependiente y osciló en el rango entre 48% y 85% como se comparó con los tumores de control. El análisis de metástasis pulmonar fue hecho en todos los animales al contar las metástasis en un estereomicroscopio y mediante análisis histoquímico de secciones pulmonares consecutivas. El celcoxib no afectó la metástasis pulmonar con la dosis menor de 160 ppm, sin embargo la metástasis de superficie fue reducida en más del 50% cuando se proporcionó a dosis entre 480-3200 ppm. Además, el análisis histopatológico reveló que el celecoxib de dosis- dependiente redujo el tamaño de las lesiones metastásicas en el pulmón.

2. Modelo HT-29:

3711

Los ratones fueron inyectados subcutáneamente en la pata izquierda (1×10^6 células tumorales suspendidas en Matrigel al 30%) y el volumen tumoral se evaluó utilizando un fletismómetro dos veces por semana durante 30-60 días. El implante de células de cáncer de colon humano (HT-29) en ratones desnudos produce tumores que alcanzarán 0.6-2 ml entre 30-50 días. Se obtuvo sangre dos veces durante el experimento en un protocolo de 24 horas para evaluar la concentración de plasma y la exposición total mediante análisis AUC. Los datos son expresados como la media +/- SEM. Las pruebas de Student's y Mann-Whitney fueron utilizadas para evaluar las diferencias entre las medias utilizando el software Instat.

A. Ratones inyectados con células de cáncer HT-29 fueron tratados con citosina intraperitonealmente en dosis de 50 mg/kg en los días 5, 7 y 9 en presencia o ausencia de celecoxib en la dieta. La eficacia de ambos agentes fue determinada mediante el volumen tumoral. El tratamiento utilizando un inhibidor de la COX-2 relacionado con celecoxib (SC-58236) redujo el volumen tumoral en un 89%. En el mismo ensayo, la indometacina proporcionada a casi la dosis máxima tolerada de 2 mg/kg/día en el agua de consumo inhibió la formación tumoral en un 77%. Además, el inhibidor selectivo de la COX-2 inhibió completamente la formación de metástasis pulmonar mientras la indometacina NSAID no selectiva no fue efectiva. Los resultados a partir de estos estudios demuestran que el celecoxib administrado en la dieta de ratones con tumor puede retardar el crecimiento de los tumores y la metástasis cuando se administra como única terapia. Además, se observa un beneficio positivo cuando el celecoxib es administrado en combinación con un agente citotóxico tal como la ciclofosfamida.

B. En un segundo ensayo, los ratones inyectados con células de cáncer de colon HT29 fueron tratados con celecoxib (10, 40 o 160 ppm) en la dieta comenzando el día 10. Se observó un efecto dependiente de la dosis. (Tabla 9).

Tabla 9: El Celecoxib Inhibe el Carcinoma de Colon Humano HT-29

Días	vehículo	10 ppm	40 ppm	160 ppm
14	0.114	0.124	0.125	0.120

378

22	0.25	0.25	0.19	0.14
28	0.45	0.36	0.27	0.21
35	0.79	0.57	0.4	0.3
42	1.38	0.89	0.68	0.49
50	1.9	1.49	1.04	0.8

Volumen (ml)

III. Ensayos in vivo utilizando proteínquinasas en combinación con un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 para el tratamiento del cáncer.

La capacidad de un inhibidor de proteínquinasas en retardar el crecimiento de tumores en combinación con un inhibidor selectivo de la COX-2 se puede probar en el modelo de xenoinjerto 1438 descrito a continuación.

El xenoinjerto 1483 es un xenoinjerto animal que representa cánceres cutáneos epiteliales humanos que expresan la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en las células tumorales y en la vasculatura.

Un modelo de ratón desnudo de xenoinjerto de tumor humano de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello (línea celular 1438) que expresa la COX-2 en las células tumorales y en la vasculatura, similar a cánceres epiteliales humanos. Creemos que este modelo representa cánceres epiteliales humanos y sería un buen modelo para correlacionar la eficacia de fármacos anticancerígenos, incluyendo inhibidores de la COX-2, con eficacia en humanos.

Materiales y Métodos

Cultivo Celular:

Las células de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello humano 1438 (NSC) son almacenadas en frascos congelados que contienen 3×10^6 células, suero bovino fetal al 90% (FBS) y sulfóxido de dimetilo al 10% (DMSO). Tomar un frasco congelado y rápidamente descongelar a 37°C y colocar en un matraz T-162 cm² (Corning) que contenga medio D-MEM/F12 (GibcoBRL) con amortiguador Hepes 15 mM, L-glutamina,

376

hidrocloruro de piridoxina y FBS al 10%. Las células crecen en un incubador con CO₂ al 5% y temperatura de 37°C. El medio es cambiado día de por medio y las células son pasadas al estar en un 80-90% de confluencia. Para el paso de células, lavar el matraz con 10 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS), aspirar y agregar 2 ml de

5 tripsina/EDTA (0.25%/ 1 mM, GibcoBRL) colocar nuevamente en el incubador, después de 5 minutos, las células se separarán. Agregar 8 ml del medio anterior para enjuagar la matraz y transferir a un tubo de centrifuga estéril de 50 ml. Agregar 30 ml más de medio y mezclar y contar las células utilizando un hematocitómetro, esparcir las células en un T-162 cm² conteniendo 3-4 x 10⁶ células.

10

Modelo Animal 1438

Cambiar el medio 24 horas antes de cosechar las células 1483 y antes de inyección a ratones desnudos. Tripsinizar las células 1483 tal como se describió anteriormente en la sección de cultivo celular. Contar las células y determinar el número de células. Centrifugar

15 las células a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Resuspender pelets de células y agruparlos (en múltiples tubos de centrifuga de 50 ml) en un tubo de centrifuga de 50 ml con solución salina amortiguada de Hank (HBSS, GibcoBRL) y centrifugar como antes. Querrá tener aproximadamente un 25% más de células de lo que realmente se necesita para inyección para así tener células extras. Si se está inyectando a 72 ratones y se

20 tiene 100 x 10⁶ células, prepare todas las células para inyectarlas a los ratones. Inyecte las células 1438 en 1 x 10⁶ células en 0.03 ml/ratón.

Inyectar células con Matrigel al 30% (Productos Medicos Colaborativos) y HBSS al 70%. Resuspender pelets agrupados con 2.1 ml (70%) de HBSS frío luego agregar 0.9 ml (30%) de Matrigel frío descongelado, licuado y mezclar bien sobre hielo. Mantener esta

25 preparación celular sobre hielo siempre antes de inyectar a los ratones. Ratones desnudos macho de 4-6 semanas de edad son utilizados en estos estudios (Harlen). Anestesiar los ratones utilizando gas CO₂/O₂ y luego inyectarlos en la parte media de la pata trasera derecha utilizando una jeringa de tuberculina de 0.5 cc (Beckerson & Dickerson). Pesar los ratones el día de la inyección (Día 0) para establecer un peso base para comenzar el estudio.

30 Pesar los ratones el día 7 y medir la pata trasera derecha para establecer volumen tumoral

377

de pata utilizando un pletismómetro (Stoettiling Co.). El pletismómetro es una máquina que mide el volumen de la pata mediante el desplazamiento de agua. Medir varias patas izquierdas no inyectadas y promediar para una medición de fondo para restar de la pata derecha con tumor.

- 5 Colocar los animales sobre compuestos de prueba en alimento cuando los tumores tengan un tamaño de 100-200ul y continuar con la comida de compuesto durante todo el estudio. A algunos ratones solamente se proporciona un inhibidor de la proteínquinasa o un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2. A algunos ratones se proporciona tanto un inhibidor de la proteínquinasa como un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2
- 10 diariamente en una dosis apropiada determinada con base en resultados de ensayos *in vitro*.

- Pesar y medir los ratones durante el estudio en los días 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28. Los animales pueden iniciar con el tratamiento con el compuesto el día 0 (profiláctico) o una vez que haya un tumor establecido alrededor del día 7 (terapéutico). Alrededor del día 30, los ratones vehículo (control) tendrán tumores grandes (~1.0-1.5 ml) y comenzarán a
- 15 perder peso, en este momento terminan con los animales de vehículo. Si se observa inhibición tumoral en los grupos tratados y están en buena condición de salud, eutanizar la mitad de los grupos tratados y mantener la mitad del grupo tratado vivo para determinar el retardo en crecimiento tumoral.

- Alguien con experiencia en el estado de la técnica también apreciará fácilmente que
- 20 el presente invento está bien adaptado para lograr los objetivos y obtener las metas y ventajas mencionadas, así como también aquellas inherentes en la presente. Los complejos moleculares y los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas, compuestos específicos descritos en la presente son actualmente representativos de realizaciones preferidas, son a manera de ejemplo, y no pretenden ser limitaciones del alcance del
- 25 invento. Los cambios en la presente y otros usos se les ocurrirán a aquellos con experiencia en el estado de la técnica los cuales están incluidos dentro del espíritu del invento y que son definidos por el alcance de las reivindicaciones.

Será fácilmente manifiesto para alguien con experiencia en el estado de la técnica que se pueden realizar sustituciones y modificaciones variables al invento divulgado en la

378

presente sin apartarse del alcance y espíritu del invento. Todas las patentes y publicaciones son incorporadas en la presente como referencia.

379

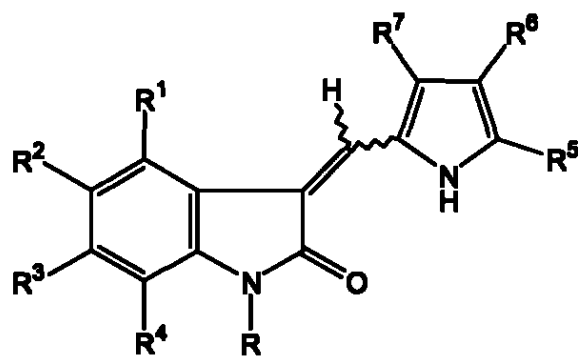
REIVINDICACIONES

5 Lo que se reivindica es:

1. Un método para el tratamiento o prevención de cánceres que comprende la administración a un mamífero en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de:

10 un inhibidor de la proteinquinasa de la Fórmula (I):

15



25 en donde:

R es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, piperazin-1-ilmetilo, 4-metilpiperazin-1-ilmetilo, piperidin-1-ilmetilo, 2-hidroximetilpirrolidin-1-ilmetilo, 2-carboxipirrolidin-1-ilmetilo, y pirrolidin-1-ilmetilo;

30 R¹ es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxilo, alcoxilo, -C(O)NR⁸R⁹, -NR¹³R¹⁴, -(CO)R¹⁵, y -(CH₂)_rR¹⁶;

R² es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, alquilo sustituido, trihalometilo, hidroxilo, alcoxilo, ciano, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -C(O)R¹⁵, arilo, heteroarilo, y -S(O)₂NR¹³R¹⁴;

35 R³ es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, trihalometilo, hidroxilo, alcoxilo, arilo, heteroarilo, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³S(O)₂R¹⁴, -S(O)₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -(CO)R¹⁵, y -SO₂R¹⁹;

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ 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
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: BUSQUEDA INTERNACIONAL

11

FIGURA CARACTERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 74.782.747 de Btá T.P. 74.295

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicacion : 04012050 00000000 Folios: 415
Fecha (MM): 2004-02-13 09:17:40
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Radicacion : 04012050 00000000 Folios: 415
Fecha (MM): 2004-02-13 09:17:40
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

MIT : 000170207 2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 10,173
FECHA : FEBRERO 9 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	VR. PAGO
PRECISION TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050 00110-0	13574215	07/02/2004	3,577,000.00

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

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01 01 SOLICITUDES	422,000.00
1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SOM: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

APOSTILLA EN PODER DE SUGEN, INC.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País : Estados Unidos de América
Este documento Público
2. ha sido firmado por Norman Goodman
3. ejerce funciones Secretario de Condado
4. Lleva el sello de condado de Nueva York

CERTIFICADO

5. En Nueva York, Nueva York
6. El 10 de octubre de 2003
7. Por el Secretario de Estado especial suplente, Estado de Nueva York
8. No. NYC- 10088273B
9. Sello del Secretario de Estado de Nueva York
10. Firma de James Bizzarri - Secretario de Estado especial suplente.

CERTIFICACION NOTARIAL

Estado de Nueva York,
Condado de Nueva York

N. 348409

Yo, Norman Goodman, Secretario de Condado y de la Corte Suprema de Justicia del Estado de Nueva York, corte de registro con sello legal, certifico por el presente que Jane E. Callahan, cuyo nombre y sello aparecen en el documento, certificado, declaración adjunto, en el momento del reconocimiento ejercía funciones de Notario Público en el Estado de Nueva York, debidamente comisionada, juramentada para actuar como tal, que por ley una comisión o certificado de su carácter oficial, y la firma autógrafa de tal Notario Público se han registrado en la oficina, que tal Notario estaba autorizado por las leyes de tal Estado a tomar y certificar declaraciones, reconocimientos, y otros instrumentos escritos que deban registrarse; certifico además que estoy familiarizado con la caligrafía del Notario público o la comparé con la registrada y considero que la firma puesta en el documento anexo es auténtica. En testimonio de lo anterior, firmo y sello con el sello oficial el día 7 de octubre de 2003. Derechos pagados US \$3.

Firma Norman Goodman-

Secretario de Condado y Corte Suprema de Nueva York- NY.

Marlén Neira
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 de octubre de 2003

2/2 5

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 4 de Septiembre de 2003 la suscrita notaria certifica que: J. Trevor Lumb, mayor y domiciliado en Estados Unidos firmo el documento anterior, y ejercía funciones de Secretario asistente de Sugén, Inc, domiciliada en San Francisco, California, Estados Unidos.

Que basó las certificaciones 3, 4 y 5 en estos documentos.

Hay sello notarial y firma del notario Jane E. Callahan

Sello Notario Público Estado de Nueva York- No. 01CA4959877- calificada en el condado de Nueva York- su comisión vence el 11- 12- 2005.

PODER

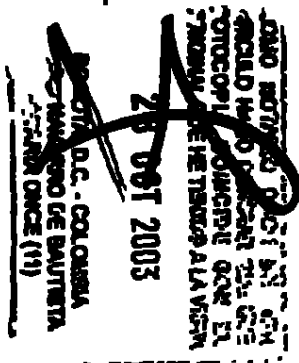
Bilingue ingles- español otorgado por SUGEN, INC. con sede en el número 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080- Estados Unidos, en relación a las patentes, modelos de utilidad y diseños industriales. Firmado por J. Trevor Dumb, Secretario Asistente -

Fecha: 8 septiembre 2003 en Nueva York- NY. Estados Unidos

--

Es traducción del inglés con copia para la traductora. Bogota, octubre 21-2003

MARLEN
Traductor e intérprete
Inglés - Español -
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1992
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1992



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

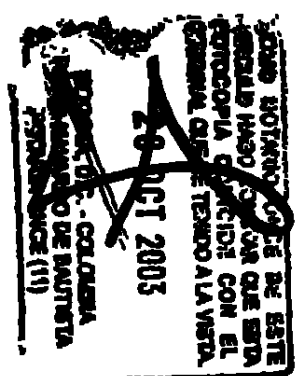
- 1. Country: **United States of America**
This public document
- 2. has been signed by **Norman Goodman**
- 3. acting in the capacity of **County Clerk**
- 4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

- 5. At New York, New York 6. the 10th day of October 2003
- 7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
- 8. No. NYC-10088273B
- 9. Seal/Stamp 10. Signature

James Bizzarri

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date, September 4,
2003,
The undersigned Notary Public certifies:

1. That J. Trevor Lumb
of legal age and domiciled in USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Assistant Secretary
Of Sugen, Inc.

3. That Sugen, Inc.,
having its principal place of business located in
So. San Francisco, Ca., USA,
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
mayor de edad y domiciliado
suscrió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en

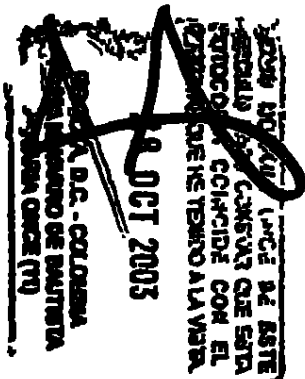
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

JANE E. CALLAHAN
Notary Public, State Of New York
No. 01CA4859877
Qualified In New York County
Commission Expires 12/11/2005



COUNTY CLERK
 State of New York
 County of New York. **NEW YORK**
 I, **NORMAN GOODWIN**, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of
 New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
 DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE +57-1 638-6200
FAX +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

El suscrito,
SUGEN, INC.

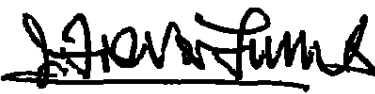
Domiciliado en

230 EAST GRAND AVENUE
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080
UNITED STATES OF AMERICA

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or Ana María Frieri full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o Ana María Frieri poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:



J. Trevor Lamb, Assistant Secretary

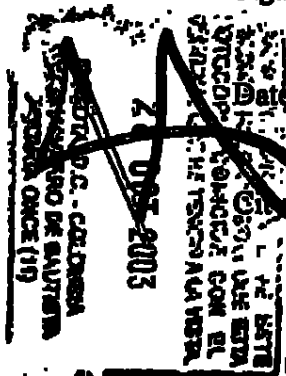
Signature Of Authorized Officer

Date/Fecha:

September 8, 2003 (8 September 2003)

Day/Month/Year

Country/Ciudad, País: New York, NY USA



TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De: OFICINA INTERNACIONAL

Para: BURROUS, Beth, A.
Foley & Lardner
Washington Harbour
Suite 500
3000 K Street N.W.
Washington, DC 20007-5143
Estados Unidos de América.

NOTIFICACION DE UN REGISTRO DE CAMBIO (Regla PCT 92bis.1 e Instrucciones Administrativas, Sección 422)

NOTIFICACION IMPORTANTE

Fecha de envío: 6 de Mayo de 2003 (06.05.03)

Referencia de Solicitante o Agente: 038602-1434

Solicitud Internacional: PCT/US02/25797

Fecha de presentación internacional: 15 de agosto de 2002 (15.08.02)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en archivo con respecto a:
 - ☒ el solicitante
 - ☐ el inventor
 - ☐ el agente
 - ☐ representante común

Nombre y Dirección:

Nacionalidad:

Residencia:

2. Por medio de la presente, la Oficina Internacional notifica al solicitante que el siguiente cambio ha sido registrado con respecto a:

- ☐ la persona
- ☐ el nombre
- ☐ la dirección
- ☐ la nacionalidad
- ☐ la residencia

Nombre y Dirección:

SUGEN, INC
230 E. Grand Avenue
South San Francisco, CA 94080-4811
Estados Unidos de América

Nacionalidad: US
Residencia: US

3. Observaciones adicionales, si dan lugar:

Solicitante adicional como se indica en el punto 2 para todos los estados designados excepto Estados Unidos de América.

4. Una copia de esta notificación ha sido enviado a:
- ☒ la Oficina receptora
 - ☒ la Autoridad de Búsqueda Internacional
 - ☒ la Autoridad Examinadora Preliminar Internacional
 - ☐ las Oficinas designadas involucradas
 - ☒ las Oficinas elegidas
 - ☐ otros:

La Oficina Internacional de la OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Ginebra 20, Suiza
Fax No. : (41-22) 740.14.35

Funcionario:
Sun LEE
Teléfono: (41-22) 338-8710

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BURROUS, Beth, A.
Foley & Lardner
Washington Harbour
Suite 500
3000 K Street N.W.
Washington, DC 20007-5143
United States of America

Date of mailing (day/month/year)

Applicant's or agent's file reference

038602-1434

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US02/26797

International filing date (day/month/year)

15 August 2002 (15.08.02)

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

SUGEN, INC.
230 E. Grand Avenue
South San Francisco, CA 94080-4811
United States of America

US

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Additional applicant in Box 2 is for all designated States except the United States of America.

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the designated Offices concerned



the International Searching Authority



the elected Offices concerned



the International Preliminary Examining Authority



other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Sun LEE

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338 8710

B

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De: OFICINA INTERNACIONAL
Para: BURROUS, Beth, A.
Foley & Lardner
Washington Harbour
Suite 500
3000 K Street N.W.
Washington, DC 20007-5143
Estados Unidos de América.

NOTIFICACION DE UN REGISTRO DE CAMBIO (Regla PCT 92bis.1 e Instrucciones Administrativas, Sección 422)

NOTIFICACION IMPORTANTE

Fecha de envío: 6 de Mayo de 2003 (06.05.03)
Referencia de Solicitante o Agente: 038602-1434
Solicitud Internacional: PCT/US02/25797
Fecha de presentación internacional: 15 de agosto de 2002 (15.08.02)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en archivo con respecto a:
- ☒ el solicitante
 - ☒ el inventor
 - ☐ el agente
 - ☐ representante común

Nombre y Dirección:

MAFERRER, Jaime
812 Courtwood Lane
Ballwin, MO 63011
Estados Unidos de América.

Nacionalidad: CL
Residencia: US

2. Por medio de la presente, la Oficina Internacional notifica al solicitante que el siguiente cambio ha sido registrado con respecto a:

- ☐ la persona
- ☐ el nombre
- ☐ la dirección
- ☐ la nacionalidad
- ☐ la residencia

Nombre y Dirección:

Nacionalidad:

Residencia:

3. Observaciones adicionales, si dan lugar:

Solicitante/inventor como se indica en el punto 1 es para Estados Unidos de América solamente.

4. Una copia de esta notificación ha sido enviado a:

☒ **la Oficina receptora**

☒ **la Autoridad de Búsqueda Internacional**

☒ **la Autoridad Examinadora Preliminar Internacional**

☐ **las Oficinas designadas involucradas**

☒ **las Oficinas elegidas**

☐ **otros:**

La Oficina Internacional de la OMPI

34, chemin des Colombettes

1211 Ginebra 20, Suiza

Fax No. : (41-22) 740.14.35

Funcionario:

Sun LEE

Teléfono: (41-22) 338-8710

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BURROUS, Beth, A.
Foley & Lardner
Washington Harbour
Suite 500
3000 K Street N.W.
Washington, DC 20007-5143
United States of America

Date of mailing (day/month/year)

06 May 2003 (06.05.03)

Applicant's or agent's file reference

038602-1434

International application No.

PCT/US02/25797

International filing date (day/month/year)

15 August 2002 (15.08.02)

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

MASFERRER, Jaime
812 Courtwood Lane
Ballwin, MO 63011
United States of America

State of Nationality

CL

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Applicant/Inventor in Box 1 is for the purposes of the United States of America only.

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the designated Offices concerned



the International Searching Authority



the elected Offices concerned



the International Preliminary Examining Authority



other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Sun LEE

Facsimile No. (41-22) 740.14.36

Telephone No. (41-22) 338 8710

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/015608 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61B
- (21) International Application Number: PCT/US02/25797
- (22) International Filing Date: 15 August 2002 (15.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/312,413 15 August 2001 (15.08.2001) US
- (71) Applicant: MASTERRER, Jaime [CL/US]; 812 Courtwood Lane, Ballwin, MO 63011 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): DOSHI, Parul [IN/US]; 16763 Hickory Crest Drive, Wildwood, MO 63011 (US). CHERRINGTON, Julie [US/US]; 354 24th Avenue #1, San Francisco, CA 94121 (US).
- (74) Agents: BURROUS, Beth, A. et al.; Foley & Lardner, Washington Harbour, Suite 500, 3000 K Street N.W., Washington, DC 20007-5143 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, **CO**, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: COMBINATION THERAPY FOR THE TREATMENT OF CANCER

(57) Abstract: The present invention relates to methods for treatment or prevention of neoplasia disorders using protein tyrosine kinase inhibitors in combination with cyclooxygenase inhibitors, in particular cyclooxygenase-2 selective inhibitors.

WO 03/015608 A2

COMBINATION THERAPY FOR THE TREATMENT OF CANCER

BACKGROUND OF THE INVENTION

5

Field of the Invention

The present invention relates to methods for treatment or prevention of neoplasia disorders using protein tyrosine kinase inhibitors in combination with cyclooxygenase inhibitors, in particular cyclooxygenase-2 selective inhibitors.

10

State of the Art

A neoplasm, or tumor, is an abnormal, unregulated, and disorganized proliferation of cell growth. A neoplasm is malignant, or cancerous, if it has properties of destructive growth, invasiveness and metastasis. Invasiveness refers to the local spread of a neoplasm by infiltration or destruction of surrounding tissue, typically breaking through the basal laminae that define the boundaries of the tissues, thereby often entering the body's circulatory system. Metastasis typically refers to the dissemination of tumor cells by lymphatics or blood vessels. Metastasis also refers to the migration of tumor cells by direct extension through serous cavities, or subarachnoid or other spaces. Through the process of metastasis, tumor cell migration to other areas of the body establishes neoplasms in areas away from the site of initial appearance.

Cancer is now the second leading cause of death in the United States and over 8,000,000 persons in the United States have been diagnosed with cancer. In 1995, cancer accounted for 23.3% of all deaths in the United States. (See U.S. Dept. of Health and Human Services, National Center for Health Statistics, Health United States 1996-97 and Injury Chartbook 117 (1997)).

Cancer is not fully understood on the molecular level. It is known that exposure of a cell to a carcinogen such as certain viruses, certain chemicals, or radiation, leads to DNA alteration that inactivates a "suppressive" gene or activates an "oncogene". Suppressive genes are growth regulatory genes, which upon mutation, can no longer control cell growth. Oncogenes are initially normal genes (called protooncogenes) that by mutation or altered context of expression become transforming genes. The products of transforming genes cause inappropriate cell growth. More than twenty different normal cellular genes can become oncogenes by genetic alteration. Transformed cells differ from normal cells in many ways,

including cell morphology, cell-to-cell interactions, membrane content, cytoskeletal structure, protein secretion, gene expression and mortality (transformed cells can grow indefinitely).

Cancer is now primarily treated with one or a combination of three types of therapies: surgery, radiation, and chemotherapy. Surgery involves the bulk removal of diseased tissue.

5 While surgery is sometimes effective in removing tumors located at certain sites, for example, in the breast, colon, and skin, it cannot be used in the treatment of tumors located in other areas, such as the backbone, nor in the treatment of disseminated neoplastic conditions such as leukemia.

10 Chemotherapy involves the disruption of cell replication or cell metabolism. It is used most often in the treatment of breast, lung, and testicular cancer.

The adverse effects of systemic chemotherapy used in the treatment of neoplastic disease is most feared by patients undergoing treatment for cancer. Of these adverse effects nausea and vomiting are the most common and severe side effects. Other adverse side effects include cytopenia, infection, cachexia, mucositis in patients receiving high doses of
15 chemotherapy with bone marrow rescue or radiation therapy; alopecia (hair loss); cutaneous complications (see M.D. Abeloff, et al: Alopecia and Cutaneous Complications. P. 755-56. In Abeloff, M.D., Armitage, J.O., Lichter, A.S., and Niederhuber, J.E. (eds) Clinical Oncology. Churchill Livingston, New York, 1992, for cutaneous reactions to chemotherapy agents), such as pruritis, urticaria, and angioedema; neurological complications; pulmonary and cardiac
20 complications in patients receiving radiation or chemotherapy; and reproductive and endocrine complications.

Chemotherapy-induced side effects significantly impact the quality of life of the patient and may dramatically influence patient compliance with treatment.

25 Additionally, adverse side effects associated with chemotherapeutic agents are generally the major dose-limiting toxicity (DLT) in the administration of these drugs. For example, mucositis, is one of the major dose limiting toxicity for several anticancer agents, including the antimetabolite cytotoxic agents 5-FU, methotrexate, and antitumor antibiotics, such as doxorubicin. Many of these chemotherapy-induced side effects if severe, may lead to hospitalization, or require treatment with analgesics for the treatment of pain.

30 The adverse side effects induced by chemotherapeutic agents and radiation therapy have become of major importance to the clinical management of cancer patients.

Currently, scientists are looking at treating cancers via the use of antiangiogenic agents. Angiogenesis is believed to be the mechanism via which tumors get needed nutrients to grow and metastasize to other locations in the body. Antiangiogenic agents interfere with these
35 processes and destroy or control tumors.

30

R^4 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, hidroxilo, alcoxilo, y $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y $-C(O)R^{10}$;

5 R^6 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y $-C(O)R^{10}$;

R^7 es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo, $-C(O)R^{17}$, y $-C(O)R^{10}$, y $-C(O)R^{10}$; siempre y cuando R es hidrógeno entonces al menos uno entre R^5 , R^6 y R^7 es $-C(O)R^{19}$; o

10 R^6 y R^7 se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo que consta de $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ y $-(CH_2)_6-$;

R^8 y R^9 son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y arilo;

R^{10} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, -
15 $N(R^{11})(alquilen) nR^{12}$ en donde el grupo alquilen es opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, y alquilo sustituido;

R^{12} es seleccionado del grupo que consta de $-NR^{13}R^{14}$, hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, $-N^+(O)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$, y $-NHC(O)R^{18}$ (en donde R^{18} es alquilo, alquilo
20 sustituido, haloalquilo, o aralquilo);

R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, cianoalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo y heteroarilo; o

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

25 R^{15} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo y ariloxilo;

R^{16} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, $-NR^{13}R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, y $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} es seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo,
30 arilo y heteroarilo;

301

R^{19} es seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, arilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo; y

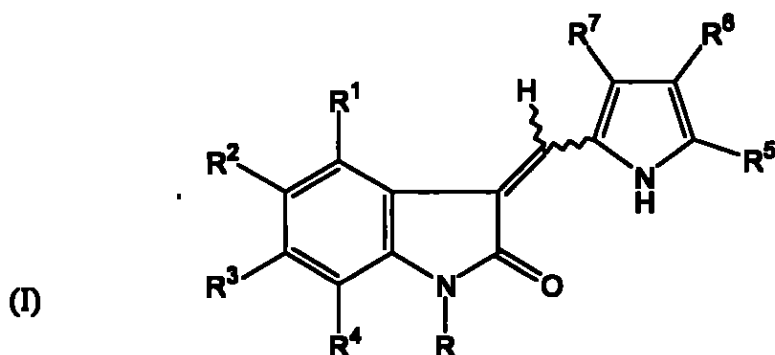
n y r son independientemente 1, 2, 3, o 4;

en combinación con un inhibidor de la ciclooxigenasa;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende la administración a un mamífero en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de:

un inhibidor de la proteinquinasa de la Fórmula (I):



en donde:

R es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, piperazin-1-ilmetilo, piperidin-1-ilmetilo, 2-hidroximetilpirrolidin-1-ilmetilo, 2-carboxipirrolidin-1-ilmetilo, y pirrolidin-1-ilmetilo;

R^1 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxilo, alcóxido, $-C(O)NR^8R^9$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CO)R^{15}$, y $-(CH_2)_rR^{16}$;

R^2 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, alquilo sustituido, trihalometilo, hidroxilo, alcóxido, 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 es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, trihalometilo, hidroxilo, alcóxido, arilo, heteroarilo, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-NR^{13}C(O)OR^{14}$, $-(CO)R^{15}$, y $-SO_2R^{19}$;

382

R^4 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, hidroxilo, alcoxilo, y $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y $-C(O)R^{10}$;

5 R^6 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y $-C(O)R^{10}$;

R^7 es seleccionado grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo, $-C(O)R^{17}$, y $-C(O)R^{10}$, y $-C(O)R^{10}$; siempre y cuando R es hidrógeno entonces al menos uno entre R^5 , R^6 y R^7 es $-C(O)R^{19}$; o

10 R^6 y R^7 se pueden combinar para formar un grupo seleccionado del grupo que consta de $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ y $-(CH_2)_6-$;

R^8 y R^9 son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, y arilo;

15 R^{10} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, - $N(R^{11})(alquilen)R^{12}$ en donde el grupo alquilen es opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, y alquilo sustituido;

20 R^{12} es seleccionado del grupo que consta de $-NR^{13}R^{14}$, hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, $-N^+(O)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$, y $-NHC(O)R^{18}$ (en donde R^{18} es alquilo, alquilo sustituido, haloalquilo, o aralquilo);

R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, cianoalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo y heteroarilo; o

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

25 R^{15} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo y ariloxilo;

R^{16} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, $-NR^{13}R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, y $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

30 R^{17} es seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, arilo y heteroarilo;

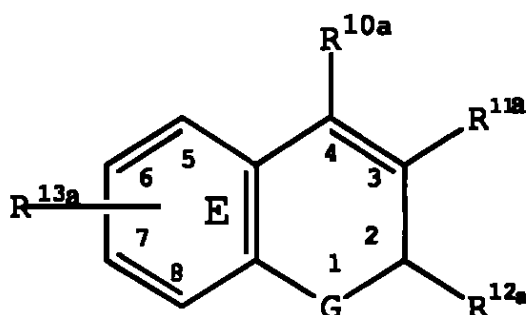
383

R^{19} es seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, arilo, aralquilo, heteroarilo, o heteroaralquilo; y

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

en combinación con un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa seleccionado del grupo que consta de:

un compuesto de la Fórmula (II):



en donde:

G es seleccionado del grupo que consta de O, S, y $-NR^a$ en donde R^a es hidrógeno o alquilo;

R^{10a} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y arilo;

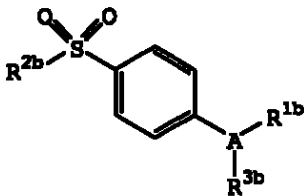
R^{11a} es seleccionado del grupo que consta de carboxilo, alquilo, aralquilo, aminocarbonilo, alquilsulfonilaminocarbonilo, y alcóxicarbonilo;

R^{12a} es seleccionado del grupo que consta de haloalquilo, alquilo, aralquilo, cicloalquilo y arilo opcionalmente sustituido con uno o más radicales seleccionados de alquiltio, nitro y alquilsulfonilo; y

R^{13a} es uno o más radicales independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, aralquilo, alcóxilo, arilóxilo, heteroarilóxilo, haloalquilo, haloalcóxilo, alquilamino, arilamino, aralquilamino, heteroarilamino, heteroarilalquilamino, nitro, amino, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, heteroarilaminosulfonilo, aralquilaminosulfonilo, heteroaralquilaminosulfonilo, heterociclosulfonilo, alquilsulfonilo, hidroxiarilcarbonilo,

384

nitroarilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, aralquilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, arilcarbonilo, aminocarbonilo, y alquilcarbonilo; o R^{13a} junto con el anillo E forma un anillo de naftilo; o un compuesto de la fórmula (III):



(III)

en donde:

A es seleccionado del grupo que consta de heterociclilo parcialmente no saturado o no saturado y anillos carbocíclicos parcialmente no saturados o no saturados;

R^{1b} es seleccionado del grupo que consta de heterociclilo, cicloalquilo, cicloalquenilo y arilo, en donde R^{1b} es opcionalmente sustituido en una posición sustituible con uno o más radicales independientemente seleccionados de alquilo, haloalquilo, ciano, carboxilo, alcoxycarbonilo, hidroxilo, hidroxialquilo, haloalcoxilo, amino, alquilamino, arilamino, nitro, alcoxialquilo, alquilsulfinilo, halo, alcoxilo, y alquiltio;

R^{2b} es seleccionado del grupo que consta de metilo y amino; y

R^{3b} es seleccionado del grupo que consta de un radical seleccionado de hidrógeno, halo, alquilo, alquenilo, alquínilo, oxo, ciano, carboxilo, cianoalquilo, heterocicliloxilo, alquilo, alquiltio, alquilcarbonilo, cicloalquilo, arilo, haloalquilo, heterociclilo, cicloalquenilo, aralquilo, heterociclihalquilo, acilo, alquiltioalquilo, hidroxialquilo, alcoxycarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, aralquenilo, alcoxialquilo, ariltioalquilo, ariloxialquilo, aralquiltioalquilo, aralcoxialquilo, alcoxiaralcoxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminocarbonilo, aminocarbonilalquilo, alquilaminocarbonilo, N-arilaminocarbonilo, N-alquil-N-arilaminocarbonilo, alquilaminocarbonilalquilo, carboxialquilo, alquilamino, N-arilamino, N-aralquilamino, N-alquil-N-aralquilamino, N-alquil-N-arilamino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, N-arilaminoalquilo, N-

265

aralquilaminoalquilo, N-alquil-N-aralquilaminoalquilo, N-alquil-N-arilaminoalquilo, ariloxilo, aralcoxilo, ariltio, aralquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo, N-arilaminosulfonilo, arilsulfonilo, y N-alquil-N-arilaminosulfonilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

3. El método de la reivindicación 2, en donde el inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa 2 es un compuesto de la fórmula (II) en donde:

G es seleccionado del grupo que consta de oxígeno y azufre;

10 R^{11a} es seleccionado del grupo que consta de carboxilo, alquilo inferior, aralquilo inferior y alcoxicarbonilo inferior;

R^{12a} es seleccionado del grupo que consta de haloalquilo inferior, cicloalquilo inferior y fenilo; y

15 R^{13a} es uno o más radicales seleccionados del grupo que consta de H, halo, alquilo inferior, alcoxilo inferior, haloalquilo inferior, haloalcoxilo inferior, alquilamino inferior, nitro, amino, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo inferior, heteroarilalquilaminosulfonilo de 5 miembros, heteroarilalquilaminosulfonilo de 6 miembros, aralquilaminosulfonilo inferior, nitrógeno de 5 miembros que contiene heterociclosulfonilo, nitrógeno de 6 miembros que contiene heterociclosulfonilo, alquilsulfonilo inferior, fenilo opcionalmente sustituido, aralquilcarbonilo inferior, y alquilcarbonilo inferior; R^{13a} junto con el anillo E
20 forma un radical de naftilo.

4. El método de la reivindicación 3 en donde:

R^{11a} es carboxilo;

R^{12a} es haloalquilo inferior; y

25 R^{13a} es uno o más radicales seleccionados del grupo que consta de H, halo, alquilo inferior, haloalquilo inferior, haloalcoxilo inferior, alquilamino inferior, amino, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo inferior, heteroarilalquilaminosulfonilo de 5 miembros, heteroarilalquilaminosulfonilo de 6 miembros, aralquilaminosulfonilo inferior, alquilsulfonilo inferior, nitrógeno de 6 miembros que contiene heterociclosulfonilo, fenilo

opcionalmente sustituido, aralquilcarbonilo inferior, y alquilcarbonilo inferior; R^{13a} junto con el anillo E forma un radical de naftilo.

5. El método de la reivindicación 4, en donde:

- 5 R^{12a} es seleccionado del grupo que consta de fluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo, difluoroetilo, difluoropropilo, dicloroetilo, dicloropropilo, difluorometilo, y trifluorometilo; y
- R^{13a} es uno o más radicales seleccionados del grupo que consta de hidrido, cloro, fluoro, bromo, yodo, metilo, etilo, isopropilo, *tert*-butilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo,
- 10 metoxilo, etoxilo, isopropiloxilo, *tert*butiloxilo, trifluorometilo, difluorometilo, trifluorometoxilo, amino, N,N-dimetilamino, N,N-diethylamino, N-fenilmetilaminosulfonilo, N-feniletilaminosulfonilo, N-(2-furilmetil)aminosulfonilo, nitro, N,N-dimetilaminosulfonilo, aminosulfonilo, N-metilaminosulfonilo, N-etilsulfonilo, 2,2-dimetiletilaminosulfonilo, N,N-dimetilaminosulfonilo, N-(2-metilpropil)aminosulfonilo, N-
- 15 morfolinossulfonilo, metilsulfonilo, benzilcarbonilo, 2,2-dimetilpropilcarbonilo, fenilacetilo y fenilo; o R^{13a} junto con el anillo E forma un radical de naftilo.

6. El método de la reivindicación 5, en donde:

- R^{12a} es seleccionado del grupo que consta de trifluorometilo y pentafluoroetilo; y
- 20 R^{13a} es uno o más radicales seleccionados del grupo que consta de hidrido, cloro, fluoro, bromo, yodo, metilo, etilo, isopropilo, *tert*-butilo, metoxilo, trifluorometilo, trifluorometoxilo, N-fenilmetilaminosulfonilo, N-feniletilaminosulfonilo, N-(2-furilmetil)aminosulfonilo, N,N-dimetilaminosulfonilo, N-metilaminosulfonilo, N-(2,2-dimetiletilo)aminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, 2-metilpropilaminosulfonilo, N-
- 25 morfolinossulfonilo, metilsulfonilo, benzilcarbonilo, y fenilo; o en donde r^{13a} junto con el anillo E forma un radical de naftilo.

7. El método de la reivindicación 2, en donde el inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es seleccionado del grupo que consta de:

- 30 ácido 6-cloro-2-trifluorometil-2H-1-benzopirán-3-carboxílico;

367

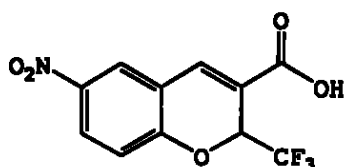
- ácido 6-cloro-7-metil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 8-(1-metiletil)-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6-cloro-7-(1,1-dimetiletil)-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6-cloro-8-(1-dimetiletil)-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
5 ácido 2-trifluorometil-3H-naftopiran-3-carboxílico;
ácido 7-(1,1-dimetiletil)-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6-bromo-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 8-cloro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6-trifluorometoxi-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
10 ácido 5,7-dicloro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 8-fenil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 7,8-dimetil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6,8-bis(dimetiletil)-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 7-(1-metiletil)-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
15 ácido 7-fenil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6-cloro-7-etil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6-cloro-8-etil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6-cloro-7-fenil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6,7-dicloro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
20 ácido 6,8-dicloro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 2-trifluorometil-3H-nafto[2,1-b]piran-3-carboxílico;
ácido 6-cloro-8-metil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 8-cloro-6-metil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 8-cloro-6-metoxi-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
25 ácido 6-bromo-8-cloro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 8-bromo-6-fluoro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 8-bromo-6-metil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 8-bromo-5-fluoro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
ácido 6-cloro-8-fluoro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
30 ácido 6-bromo-8-metoxi-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;

308

- ácido 6-[[[(fenilmetil)amino]sulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6-[(dimetilamino)sulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6-[(metilamino)sulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6-[(4-morfolino)sulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 5 ácido 6-[(1,1-dimetiletil)aminosulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6-[(2-metilpropil)aminosulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6-metilsulfonil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 8-cloro-6-[[[(fenilmetil)amino]sulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-
 carboxílico;
 10 ácido 6-fenilacetil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6,8-dibromo-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 8-cloro-5,6-dimetil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6,8-dicloro-(S)-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6-bencilsulfonil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 15 ácido 6[[[N-(2-furilmetil)amino]sulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6-[[N-(2-feniletil)amino]sulfonil]-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 6-yodo-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico;
 ácido 7-(1,1-dimetiletil)-2-pentafluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico; y
 ácido 6-cloro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico; o una sal farmacéuticamente
 20 aceptable del mismo.

8. El método de la reivindicación 2, en donde el inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa 2 es un compuesto seleccionado del grupo que consta de:

25 a)

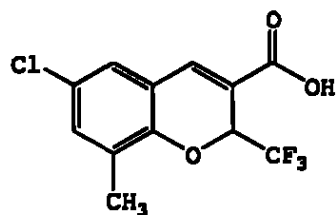


6-Nitro-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

3501

ácido 6-nitro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico

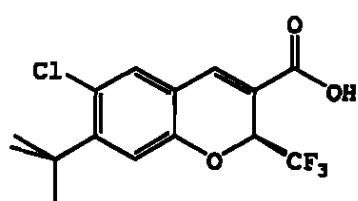
b)



6-Chloro-8-methyl-2-trifluoromethyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

5 ácido 6-cloro-8-metil-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico

c)

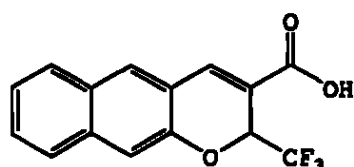


((S)-6-Chloro-7-(1,1-dimethylethyl)-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

ácido ((S)-6-cloro-7-(1,1-dimetiletil) -2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico

10

d)



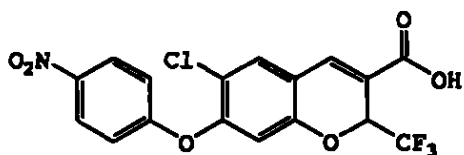
2-Trifluoromethyl-2H-naphtho[2,3-b]pyran-3-carboxylic acid

ácido 2-trifluorometil-2H-nafto[2,3-b]piran-3-carboxílico

15

e)

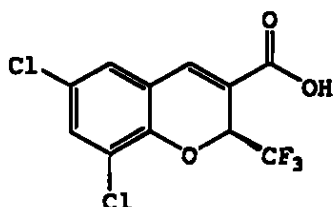
320



6-Chloro-7-(4-nitrophenoxy)-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

ácido 6-cloro-7-(4-nitrofenoxi)-2-(trifluorometil)-2H-1-benzopiran-3-carboxílico

f)

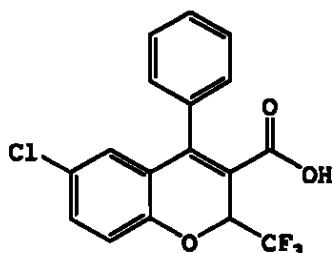


((S)-6,8-Dichloro-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

5

ácido ((S)-6,8-dicloro-2-(trifluorometil)-2H-1-benzopiran-3-carboxílico

g)



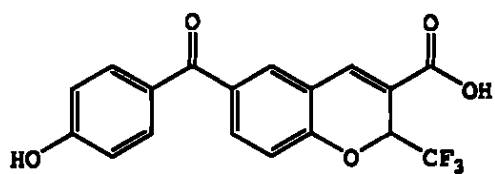
6-Chloro-2-(trifluoromethyl)-4-phenyl-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

10

ácido 6-cloro-2-(trifluorometil)-4-fenil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico

h)

gal

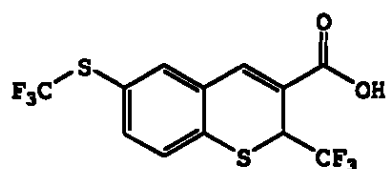


6-(4-Hydroxybenzoyl)-2-(trifluoromethyl)-
-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid

ácido 6-(4-hidroxibenzoil)-2-(trifluorometil)-2H-1-benzopiran-3-carboxílico

5

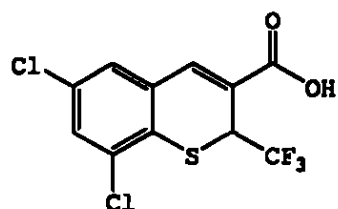
i)



2-(Trifluoromethyl)-6-[(trifluoromethyl)thio]-
-2H-1-benzothiopyran-3-carboxylic acid

ácido 2-(trifluorometil)-6-[(trifluorometil)tio]-2H-1-benzotiopiran-3-carboxílico

10 j)

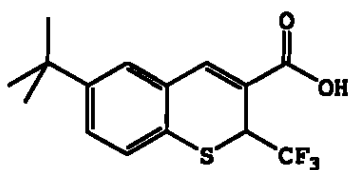


6,8-Dichloro-2-trifluoromethyl-2H-1-
benzothiopyran-3-carboxylic acid

ácido 6,8-dicloro-2-trifluorometil-2H-1-benzopiran-3-carboxílico

k)

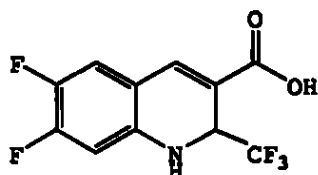
392



6-(1,1-Dimethylethyl)-2-(trifluoromethyl)-2H-1-benzothiopyran-3-carboxylic acid

ácido 6-(1,1-dimetiletil)-2-(trifluorometil)-2H-1-benzotiopiran-3-carboxílico

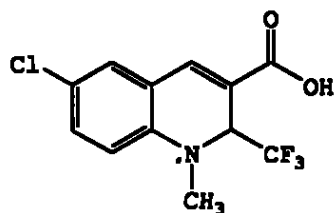
l)



5 6,7-Difluoro-1,2-dihydro-2-(trifluoromethyl)-3-quinolinecarboxylic acid

ácido 6,7-difluoro-1,2-dihidro-2-(trifluorometil)-3-quinolinocarboxílico

m)

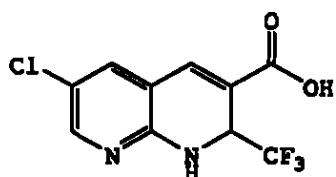


6-Chloro-1,2-dihydro-1-methyl-2-(trifluoromethyl)-3-quinolinecarboxylic acid

10 ácido 6-cloro-1,2-dihidro-1-metil-2-(trifluorometil)-quinolinocarboxílico

n)

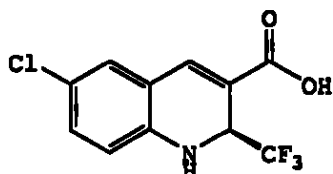
393



6-Chloro-2-(trifluoromethyl)-1,2-dihydro
[1,8]naphthyridine-3-carboxylic acid

ácido 6-cloro-2-(trifluorometil)-1,2-dihidro[1,8]naftiridina-3-carboxílico

o)



5 ((S)-6-Chloro-1,2-dihydro-2-(trifluoro
methyl)-3-quinolinecarboxylic acid

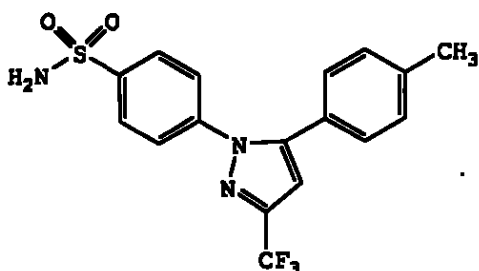
ácido ((S)-6-cloro-1,2-dihidro-2-(trifluorometil)-3-quinolinacarboxílico

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y cualquier combinación de los mismos.

10

9. El método de la reivindicación 2, en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es un compuesto de la fórmula (III) seleccionado del grupo que consta de:

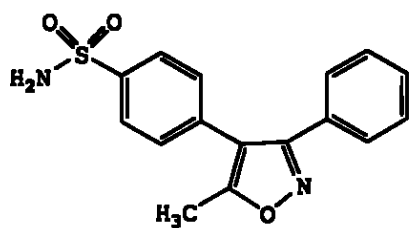
a)



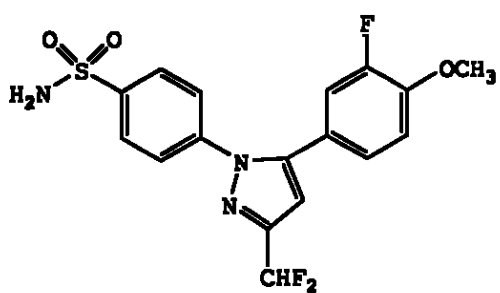
15

344

b)

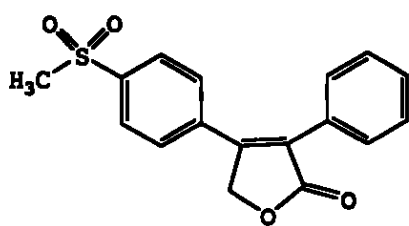


c)

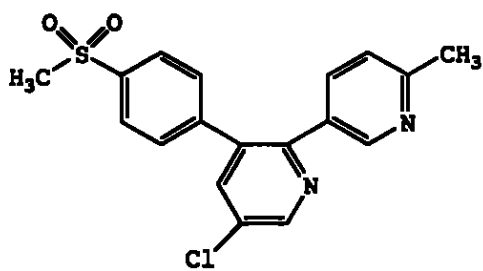


5

d)



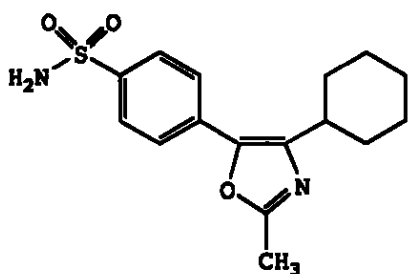
e)



10

f)

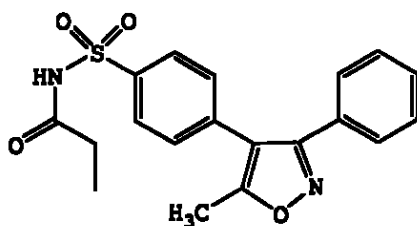
3/5



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y cualquier combinación del mismo.

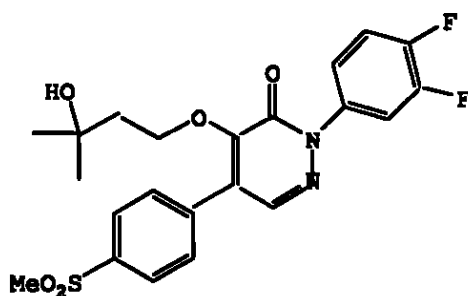
10. El método de la reivindicación 3, en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es seleccionado del grupo que consta de:

10 a)



y

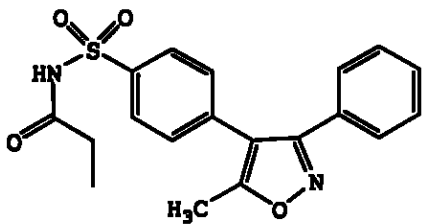
b)



15 o una sal farmacéuticamente del mismo; y cualquier combinación de los mismos.

396

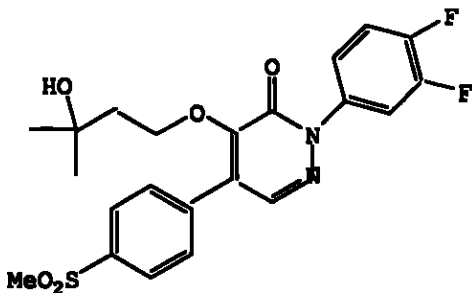
11. El método de la reivindicación 2, en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2 es:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. El método de la reivindicación 2, en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2 es



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. El método de la reivindicación 1 en donde el inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2 es 4-[4-(metil)-sulfonil]fenil]-3-fenil-2(5H)-furanona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

14. El método de la reivindicación 2 en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2 es 4-[(5-metil-3-fenil)-4-isoxazolil]fenilsulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

397

15. El método de la reivindicación 1 en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es 2-(6-metilpirid-3-il)-3-(4-metilsulfonilfenil)-5-cloropiridina, o una sal farmacéuticamente aceptable.

5 16. El método de la reivindicación 2 en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-H-pirazol-1-il]fenilsulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable.

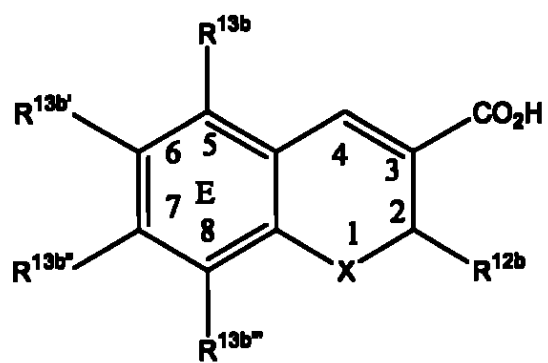
17- El método de la reivindicación 2 en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es 4-[(2-metil-4-ciclohexil)-5-oxazolil]fenilsulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable.

18. El método de la reivindicación 2 en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es 4-[5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-3-(difluorometil)-1H-pirazol-1-il]-bencenosulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable.

19. El método de la reivindicación 2 en donde dicho inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es el ácido (S)-6,8-dicloro-2-(trifluorometil)-2H-1-benzopiran-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable.

20. El método de la reivindicación 2, en donde el inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 es un compuesto de la fórmula:

en donde:



298

X es O ó S;

R^{12b} es haloalquilo inferior;

R^{3b} es seleccionado del grupo que consta de hidrido y halo;

R^{3b} es seleccionado del grupo que consta de hidrido, halo, alquilo inferior,

- 5 haloalcoxilo inferior, alcoxilo inferior, aralquilcarbonilo inferior, dialquilaminosulfonilo inferior, alquilaminosulfonilo inferior, aralquilaminosulfonilo inferior, heteroaralquilaminosulfonilo inferior, un nitrógeno de 5 miembros que contiene heterociclosulfonilo, y un nitrógeno de 6 miembros que contiene heterociclosulfonilo;

- 10 R^{13b''} es seleccionado del grupo que consta de hidrido, alquilo inferior, halo, alcoxilo inferior, y arilo; y

R^{13b''} es seleccionado del grupo que consta de hidrido, halo, alquilo inferior, alcoxilo inferior, y arilo; o
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 21. El método de la reivindicación 20, en donde:

R^{12b} es seleccionado del grupo que consta de trifluorometilo y pentafluoroetilo;

R^{13b} es seleccionado del grupo que consta de hidrido, cloro, y fluoro;

- 20 R^{13b'} es seleccionado del grupo que consta de hidrido, cloro, bromo, fluoro, yodo, metilo, tert-butilo, trifluorometoxilo, metoxilo, bencilcarbonilo, dimetilaminosulfonilo, isopropilaminosulfonilo, metilaminosulfonilo, bencilaminosulfonilo, feniletilaminosulfonilo, metilpropilaminosulfonilo, metilsulfonilo, y morfolinosulfonilo;

R^{13b''} es seleccionado del grupo que consta de hidrido, metilo, etilo, isopropilo, tert-butilo, cloro, metoxilo, dietilamino y fenilo; y

- 25 R^{13b'''} es seleccionado del grupo que consta de hidrido, cloro, bromo, fluoro, metilo, etilo, tert-butilo, metoxilo, fenilo.

22. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la fórmula (I) en donde:

399

R^1 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, hetroalíciclico, hidroxilo, alcoxilo, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)R^{16}$ y $-C(O)NR^8R^9$;

5 R^2 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halo, alquilo, trihalometilo, hidroxilo, alcoxilo, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, arilo, heteroarilo, y $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, alquilo, trihalometilo, hidroxilo, alcoxilo, $-(COR^{15})$, $-NR^{13}R^{14}$, arilo, heteroarilo, $-R^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, y $-NR^{13}C(O)OR^{14}$;

10 R^4 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, alquilo, hidroxilo, alcoxilo y $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, y $-C(O)R^{10}$;

R^6 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, y $-C(O)R^{10}$;

15 R^7 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, arilo, 3-carboxipropilo, 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 que consta de $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, y $-(CH_2)_6$;

R^8 y R^9 son seleccionados de manera independiente entre hidrógeno, alquilo y arilo;

20 R^{10} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ y $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo;

R^{12} es seleccionado del grupo que consta de $-NR^{13}R^{14}$, hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, arilo y heteroarilo;

25 R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo;

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

R^{15} es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo, y ariloxiclo;

2400

R^{16} es seleccionado del grupo que consta de hidroxilo, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ y $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} es seleccionado del grupo que consta de alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo;
y

5 n y r son independientemente 1, 2, 3 o 4;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

23. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la fórmula (I) en donde:

10 R^6 es $-COR^{10}$ en donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ en donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior;

n es 2 ó 3; y

R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} y R^{14} son independientemente alquilo inferior.

15 24. El método de la Reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la fórmula (I) en donde:

R^6 es $-COR^{10}$ en donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ en donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior;

n es 2 ó 3; y

20 R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} y R^{14} se combinan para formar un grupo seleccionado entre $(CH_2)_4$ -, $-(CH_2)_5$ -, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2$ - o $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$ -.

25. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un

compuesto de la fórmula (I) en donde R^6 es N-(2-dimetilamino-etil)aminocarbonilo, N-(2-

25 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.

401

26. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la Fórmula (I) en donde R^6 es N-(2-dietilaminoetil)aminocarbonilo o N-(2-etilamino-etil)aminocarbonilo.

27. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la Fórmula (I) en donde R^6 es 3-pirrolidin-2-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.

28. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la Fórmula (I) en donde R^6 es $-COR^{10}$ en donde R^{10} es $-R^{13}R^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo inferior sustituido con hidroxilo, arilo, heteroalíclico, heteroarilo, o carboxilo.

29. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la Fórmula (I) en donde 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-il-etilaminocarbonilo.

30. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la Fórmula (I) en donde:

R^6 es $-COR^{10}$ en donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ en donde:
 R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior;
 n es 2 ó 3; y
 R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} y R^{14} se combinan juntos para formar un heterociclo.

31. El método de la reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la Fórmula (I) en donde:

402

R^6 es COR^{10} en donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ en donde:

R^{11} es hidrógeno o alquilo inferior;

n es 2 ó 3; y

R^{12} es $-NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} y R^{14} juntos se combinan para formar un heterociclo

5 de 5, 6 o 7 átomos dentro del anillo.

32. El método de la Reivindicación 2 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la Fórmula (I) en donde 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.

15 33. El método de cualquier reivindicación 22-32 en donde el inhibidor de la proteinquinasa es un compuesto de la Fórmula (I) en donde:

R^5 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno y alquilo inferior; y

R^7 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, y $-C(O)R^{17}$, en donde R^{17} es hidroxilo, alquilo inferior o arilo.

20

34. El método de la Reivindicación 33 en donde:

R^1 es hidrógeno, alquilo inferior, $-C(O)NR^8R^9$, cicloalquilo o arilo;

R^2 es hidrógeno, halo, alcoxilo inferior, ciano, arilo, $-SO_2R^{20}$, o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo;

25 R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alcoxilo inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo y heteroarilo; y

R^4 es hidrógeno.

35. El método de la reivindicación 34 en donde:

30 R^1 es hidrógeno o fenilo;

R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, fluoro, metoxilo, etoxilo, fenilo, dimetilaminosulfonilo, ciano, metilsulfonilo, etilsulfonilo, bencilsulfonilo, 3-clorofenilaminosulfonilo, carboxilo, metoxilo, aminosulfonilo, metilaminosulfonilo, fenilaminosulfonilo, piridin-3-il-aminosulfonilo, dimetilaminosulfonilo, o isopropilaminosulfonilo;

R^3 es hidrógeno, metoxilo, carboxilo, fenilo, piridin-3-ilo, 3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-isopropilfenilo, 4-n-butilfenilo, 3-isopropilfenilo; y

R^4 es hidrógeno.

36. El método de la reivindicación 35 en donde:

R^1 es hidrógeno;

R^2 es hidrógeno, ciano, fluoro, cloro, o bromo;

R^3 es fenilo; y

R^4 es hidrógeno.

37. El método de la Reivindicación 2 en donde:

R^1 es hidrógeno, alquilo inferior, $-C(O)NR^8R^9$, cicloalquilo o arilo;

R^2 es hidrógeno, halo, alcoxilo inferior, ciano, arilo o $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es hidrógeno, arilo o alquilo;

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, alcoxilo inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arilo, y heteroarilo; y

R^4 es hidrógeno.

38. El método de la reivindicación 2 en donde:

R^1 es hidrógeno, o metilo;

R^2 es hidrógeno, ciano, cloro, fluoro, o bromo;

R^3 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno o fenilo; y

R^4 es hidrógeno.

404

39. El método de la Reivindicación 2 en donde R^6 es $-COR^{10}$, en donde R^{10} es $-NR^{13}R^{14}$, en donde R^{13} es hidrógeno y R^{14} es alquilo inferior sustituido con hidroxilo, alquilo inferior sustituido con hidroxialquilamino, carboxilo, o $-NR^{18}R^{19}$ en donde R^{18} y R^{19} son independientemente hidrógeno o alquilo inferior.

5

40. El método de la Reivindicación 2 en donde R^6 es [2-(dietilamino)-2-hidroxi]etilaminocarbonilo, 2-(N-etil-N-2-hidroxiethylamino)-etilaminocarbonilo, carboximetilaminocarbonilo, o 2-hidroxiethyl-aminocarbonilo.

10 41. El método de la Reivindicación 2 en donde R^6 es $-COR^{10}$, en donde R^{10} es $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, en donde R^{12} es $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$ o $-N(OH)R^{13}$, en donde R^{13} y R^{14} son independientemente seleccionados del grupo que consta de alquilo inferior.

15 42. El método de la Reivindicación 2 en donde R^6 es 2-(N-hidroxi-N-etilamino)etilaminocarbonilo o 2-[$N^+(O^-)(C_2H_5)_2$]etil-aminocarbonilo.

43. El método de la Reivindicación 41 o 42 en donde:

R^5 es seleccionado del grupo que consta de hidrógeno, o metilo; y

R^7 es seleccionado del grupo que consta de metilo, hidrógeno o fenilo.

20

44. El método de la reivindicación 2 en donde:

R^1 es hidrógeno;

R^2 es hidrógeno, ciano, cloro, fluoro, o bromo;

R^3 es hidrógeno; y

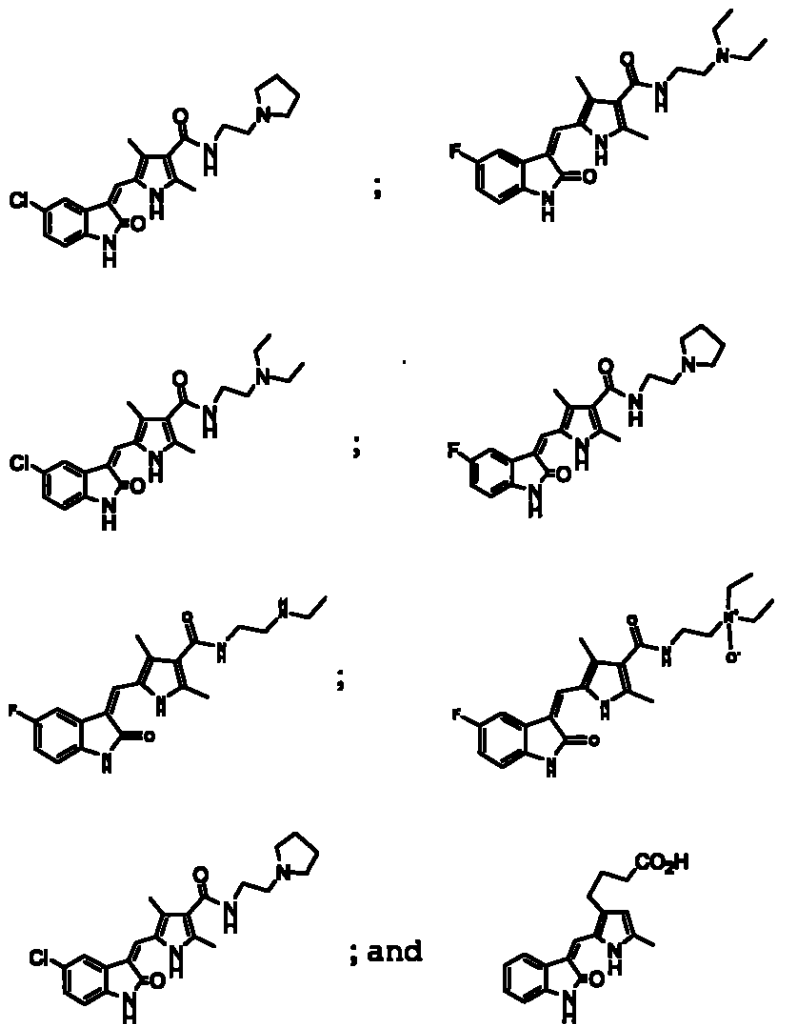
25

R^4 es hidrógeno.

45. El método de la Reivindicación 2, en donde el inhibidor de la quinasa es seleccionado del grupo que consta de:

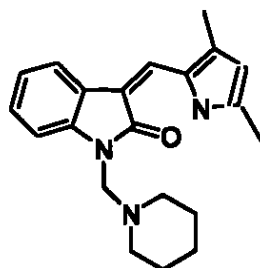
30

406



o una sal de L-malato del mismo.

- 5 46. El método de la reivindicación 2, en donde el inhibidor de la quinasa es un compuesto de la fórmula:

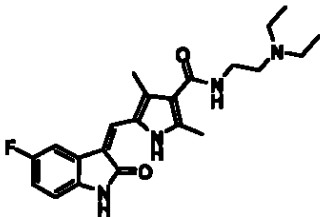


406

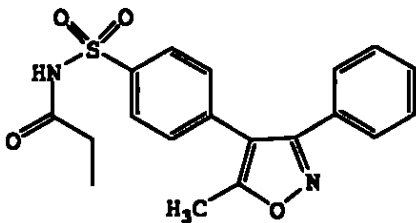
47. Un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende la administración a un mamífero en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de:

un inhibidor de la proteinquinasa de la Fórmula (I):

5



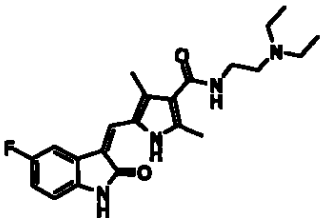
en combinación con un inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2 de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

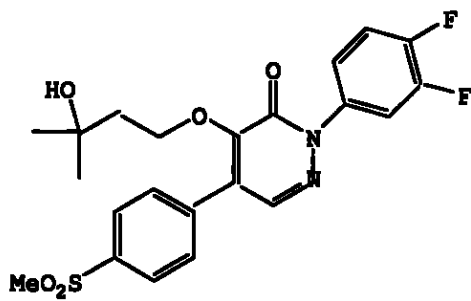
10 48. Un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende la administración a un mamífero en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de:

un inhibidor de la proteinquinasa de la fórmula (I):



202

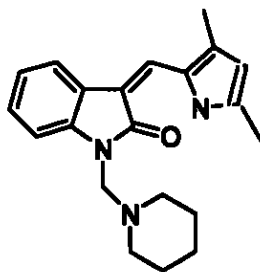
en combinación con un inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2 de la fórmula:



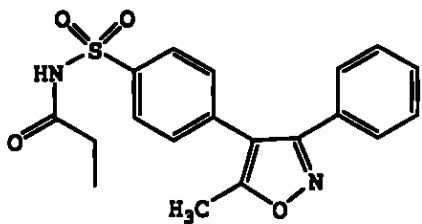
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

49. Un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende la administración a un mamífero en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de:

10 un inhibidor de la proteinquinasa de la Fórmula (I):



en combinación con un inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2 de la fórmula:



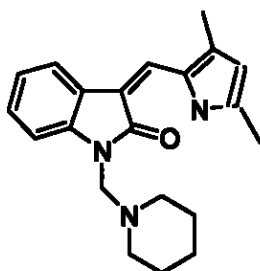
15

408

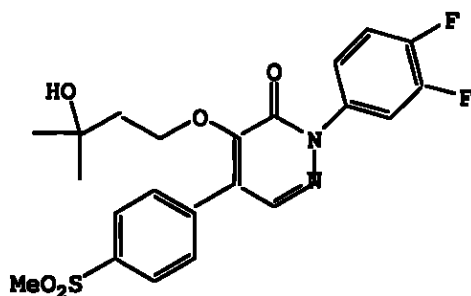
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50. Un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende la administración a un mamífero en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de:

un inhibidor de la proteinquinasa de la fórmula (I):



en combinación con un inhibidor selectivo de la ciclooxygenasa-2 de la fórmula:



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6/09

Resumen

El presente invento se relaciona con métodos de tratamiento o prevención de trastornos neoplásicos utilizando inhibidores de la tirosinquinasa en combinación con
5 inhibidores de la ciclooxigenasa, en particular inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:
BETH A. BURROUS
FOLEY & LARDNER
WASHINGTON HARBOUR
3000 K STREET, N.W., SUITE 500
WASHINGTON, DISTRICT OF COLUMBIA
20007-5101

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))

Date of mailing
(day/month/year)

07 APR 2003

Applicant's or agent's file reference

038602-1434

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US02/25797

International filing date (day/month/year)

15 Aug 2002

Priority date (day/month/year)

15 Aug 2001

Applicant

SUGEN, INC.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

- ☒ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).
☐ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).
☐ the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. ☐ **ATTENTION:** That date of receipt is AFTER the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the PCT Applicant's Guide, Volume II.

☐ (If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPEA/

Assistant Commissioner for Patent, Box PCT
Washington, D.C. 20231 Attn:RO/US

Authorized officer

Nhu Thuy Tran

Facsimile No. 703-305-3230

Telephone No. 703-605-1537

Form PCT/IPEA/402 (July 1998)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
 BETH A. BURROUS
 FOLEY & LARDNER
 WASHINGTON HARBOUR
 3000 K STREET, N.W., SUITE 500
 WASHINGTON, DC 20007-5143

PCT

 NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
 THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

 Date of Mailing
 (day/month/year) **14 MAR 2003**

 Applicant's or agent's file reference
 036602-1434

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

 International application No.
 PCT/US02/25797

 International filing date
 (day/month/year)
 15 August 2002 (15.08.2002)

 Applicant
 MASFERRER, JAMIE

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 30 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
 Commissioner for Patents
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231
 Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized Officer

William E. Jarvis

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/220 (April 2003)

(See patent law administrative matters)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 038602-1434	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 3 below.
International application No. PCT/US02/25797	International filing date (day/month/year) 15 August 2002 (15.08.2002)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 15 August 2001 (15.08.2001)
Applicant MASFERRER, JAIME		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☒ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures

413

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/25797

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

4714

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/25797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 31/50, 31/44, 31/47, 31/445, 31/42, 31/415, 31/40, 31/38, 31/35, 31/34
 US CL : 514/247, 300, 311, 323, 334, 374, 378, 406, 414, 432, 454, 456, 473

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 514/247, 300, 311, 323, 334, 374, 378, 406, 414, 432, 454, 456, 473

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,972,986 A (SEIBERT et al) 26 October 1999 (26.10.1999), columns 1-3 and the claims.	1, 2, 9-18, 22-50
Y	US 6,077,890 A (CARTER et al) 20 June 2000 (20.06.2000), columns 1-3 and the claims.	1-8 and 19-46
Y, E	US 2002/0156292 A1 (TANG et al) 24 October 2002, pages 1-4 and the claims.	1-50

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the present state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Date of the actual completion of the international search

07 February 2003 (07.02.2003)

Date of mailing of the international search report

14 MAR 2003

Name and mailing address of the ISA/US
 Commissioner of Patents and Trademarks
 Box PCT
 Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703)305-3230

Arthur D. Officer
 William R. Jarvis

Telephone No. 703-308-1235

415

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/25797

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-8 and 19-46, drawn to a method for the treatment or prevention of cancers comprising administering a protein kinase inhibitor of Formula I in combination with a cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor of Formula II.

Group II, claims 1, 2, 9-18, and 22-30, drawn to a method for the treatment or prevention of cancers comprising administering a protein kinase inhibitor of Formula I in combination with a cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor of Formula III.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reason: Although the two groups have in common the technical feature of being COX-2 inhibitors, this is not a special technical feature since the COX-2 inhibitors of both Formula II and III were well-known at the time of applicant's invention as made evident by the prior art references cited herein. Furthermore, the claimed COX-2 inhibitors were also known to be effective at treating conditions other than cancer, such as inflammatory disorders. Accordingly, this finding of lack of unity of invention is proper.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

STN (REGISTRY (structure searches of each Merckish group of compounds), CAPLUS, USPAIFUL)

search terms: cancer, tumor, tumour, neoplasm, protein kinase inhibitor, cyclooxygenase-2 inhibitor, COX-2 inhibitor

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
 Radicación : 04012050 00000000 Folios: 415
 Fecha (AND): 2004-02-13 09:17:40
 Trámite : 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

		USUARIO	RADICADOR
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 se 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 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 ()		

Firma Responsable: *Claudia H. Nery*

Fecha: 13.02.04



2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
CARLOS R OLARTE
Apoderado
SUGEN, INC Y PHARMACIA CORPORATION

Oficio N° 62475

ASUNTO:	Radicación N°	04-12058
	Solicitud Internacional	PCT/US02/25797
	Fecha Inicio fase nacional	15/03/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001 o 002

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 28-k) Decisión 486).
- El inventor Jaime Masferrer referidos en la solicitud nacional, no se encuentra referido en la solicitud internacional. Anexar documentos para aclarar.
- El solicitante ante la oficina internacional es diferente al solicitante ante la oficina nacional. Anexar documentos para aclarar.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos 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 numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 9.3 MAR. 2004.