05-594 83

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21 **EXPEDIENTE No** 05-594 83

54 **TITULO** COMPUESTOS DE INDAZOL Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA INHIBIR PROTEINQUINASAS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU USO

51 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71 **SOLICITANTE** PFIZER INC

DOMICILIO DELAWARE - ESTADOS UNIDOS

74 **APODERADO** _____

22 **BOGOTA, D C ,** _____

(FORMA P-10)

1997 - Imprenta nacional - Colombia - 2001

OLARTERAISBECK

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 05350483 00000000 Folios: 34
Fecha (AMD) : 2005-06-17 17:20:19
Trámite : 211 PCT-PATENT 379 FASE NACI 111 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 19-07-05

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[ ] Capítulo I. [X] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: PFIZER INC
Dirección: 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 E.U.A.
Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE
Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América.
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Wold Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual _____
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: (1) ALLEN JOHN BORCHARDT; (2) ROBERT STEVEN KANIA (3) CYNTHIA LOUISE PALMER
Dirección: (1,2 y 3) 10777 Science Center Drive, San Diego, California 92121, E.U.A.
Nacionalidad o Domicilio: (1,2 y 3) Estadounidense

(3) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/IB2003/005854 Fecha Diciembre 8, 2003

Publicación Internacional No. WO 2004/056806 Fecha Julio 8, 2004

(4) **Título (54) COMPUESTOS DE INDAZOL Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA INHIBIR PROTEINQUINASAS, Y PROCEDIMIENTOS PARA SU USO.**

(7) **Clasificación Internacional (51)** C07D 401/14; 401/06; 403/12; 403/14; 231/56; 405/14; A61K 31/416; A61P 35/00; 27/02

(8) **Prioridad** SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Diciembre 19, 2002	60/434,902

(9) **Comprobante de pago No.** 44,737 **Fecha** Junio 15, 2005

(10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [x] 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.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 44.737
FECHA : JUNIO 15 DE 2005

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JOSE SANTOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36227742	15/06/2005	3,987,000.00

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

CANT.	REMTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.
		TOTAL : $	443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE

PFIZER INC.

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejercía funciones de Asistente General Consejero de Patentes la Compañía Pfizer Inc., con sede en Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman

Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
   Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público

CERTIFICADÓ

5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210434
9. El sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlen Neira C

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

5

OLARTERAISBECK

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,

Pfizer Inc.

domiciled in

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and 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 to revoke such substitutions.

Poder

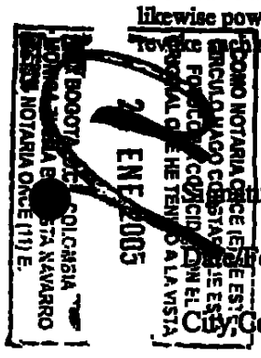
El suscrito,

Pfizer Inc.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

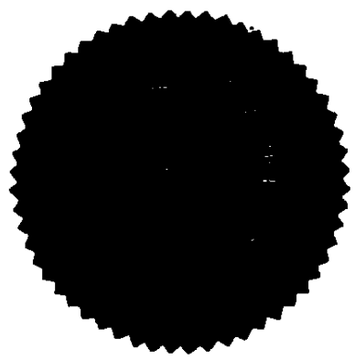
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, 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: _____

Date/Fecha: July 14, 2003

City,Country/Ciudad,País: New York, USA



OLARTERAISBECK

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,
July 14, 2003
The undersigned Notary Public certifies:

1. That J. Trevor Lumb
of legal age and domiciled in New York, USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Assistant General Patent Counsel of Pfizer Inc.

3. That Pfizer Inc.,
having its principal place of business located in
New York, New York, U.S.A.
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 [illegible] and 4 was the exhibition of the following [illegible] document(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey
This 16th Day Of July 2003

KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscribió 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 suscribir 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):

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
   Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

   This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by — K Greenwood
   a été signé par

3. Acting in the capacity of — Notary Public
   agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of — The Said Notary Public
   est revêtu du sceau/timbre de

   Certified/Attesté

5. at London/à Londres — 6. the/le 17 July 2003

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
   par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

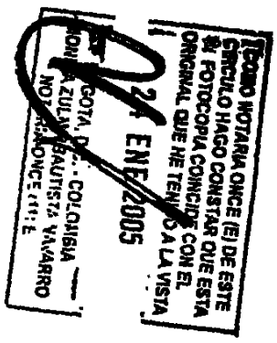
8. Number/sous No — G210434

9. Stamp:
   timbre:

10. Signature: R. Bawden

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country.



CO-1

CESION

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por PFIZER INC, sociedad constituida en virtud de las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, cuya dirección postal completa es 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, Estados Unidos de América, por el presente vendemos y traspasamos a la citada PFIZER INC, todo nuestro derecho, titulo e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en COMPUESTOS DE INDAZOL Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA INHIBIR PROTEINOQUINASAS, Y PROCEDIMIENTOS PARA SU USO, en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada PFIZER INC., de conformidad con esta Cesión.

En fe de lo cual, firmamos de nuestro puño y letra,

San Diego, CA, 04 de junio de 2005 (Fdo). Allen John BORCHARDT
Lugar, fecha y firma - Allen John BORCHARDT

San Diego, CA, 12 de mayo de 2005 (Fdo). Robert Steven KANIA
Lugar, fecha y firma - Robert Steven KANIA

San Diego, CA, 17 de mayo de 2005 (Fdo). Cynthia Louise PALMER
Lugar, fecha y firma - Cynthia Louise PALMER

Por el presente certifico que este es el documento original.
Sami Swadek (10/jun/05)

Suscrito y jurado ante mí, el 10 de junio de 2005.
(Fdo.) ALBERT L. THEMES, Notario Público de Washington Distrito Capital, cuyo cargo vence el 14 de junio de 2009, según consta en su correspondiente sello notarial.

(Sello Oficial)

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

1. País: Distrito de Columbia

   Estados Unidos de América

2. El presente documento público fue firmado por: Albert L. Themes

3. Que actuó en su calidad de Notario Público en y para el Distrito de Columbia

4. Lleva el sello Albert L. Themes, en su calidad de Notario Público del Distrito de Columbia.

   SE CERTIFICÓ

5. En Washington D.C.

6. El 10 de junio de 2005

7. Por parte del Secretario del Distrito de Columbia.

8. Bajo el Número 142940

9. Aparece el sello del Distrito de Columbia

10. Firmado por Sherryl H. Newman.

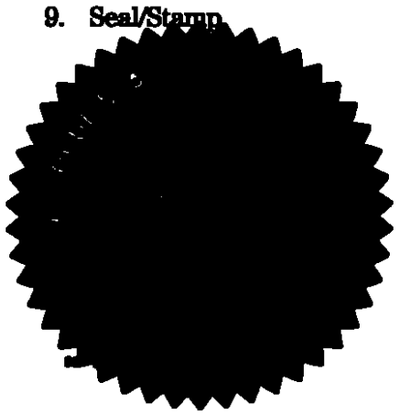
Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
   United States of America
2. This public document has been signed by ALBERT L. THEMES
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA
   ALBERT L. THEMES, PUBLIC IN AND FOR THE
4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 10 day of JUNE 2005
7. by *Secretary of the District of Columbia*
8. No. 142940
9. Seal/Stamp



10. Signature



PC19172A

CO-1

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER INC.** a corporation organized under the laws of the State of Delaware, United States of America whose full post office address is 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **INDAZOLE COMPOUNDS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR INHIBITING PROTEIN KINASES, AND METHODS FOR THEIR USE** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

San Diego CA 6-4-05 Allen Borchardt

Place, date and signature - Allen John BORCHARDT

San Diego CA 5/17/2005

Place, date and signature - Robert Steven KANIA

San Diego, CA May 17, 2005 Cynthia L Palmer

Place, date and signature - Cynthia Louise PALMER

I HEREBY CERTIFY THAT THIS
IS THE ORIGINAL DOCUMENT
SAM SWANEK 6.10.6

Subscribed and sworn to before me, in my presence, this
10 day of June, 2006, a Notary Public
in and for the [illegible] of DC.

[illegible]
Notary Public

My commission expires 6/14, 2009

ALBERT L. THEMES
NOTARY PUBLIC DISTRICT OF COLUMBIA
My Commission Expires June 14, 2009

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 July 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/056806 A1

(51) International Patent Classification[7]: C07D 401/14, 401/06, 403/12, 403/14, 231/56, 405/14, A61K 31/416, A61P 35/00, 27/02

(21) International Application Number: PCT/IB2003/005854

(22) International Filing Date: 8 December 2003 (08.12.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/434,902 19 December 2002 (19.12.2002) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): PFIZER INC. [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): BORCHARDT, Allen, John [US/US]; Agouron Pharmaceuticals Inc., 10777 Science Center Drive, San Diego, CA 92121 (US). KANIA, Robert, Steven [US/US]; Agouron Pharmaceuticals Inc., 10777 Science Center Drive, San Diego, CA 92121 (US). PALMER, Cynthia, Louise [US/US]; Agouron Pharmaceuticals Inc., 10777 Science Center Drive, San Diego, CA 92121 (US).

(74) Agents: LUMB, J., Trevor et al.; Pfizer Inc., c/o Jackie Lawrence, Eastern Point Road MS8260-1615, Groton, CT 06340 (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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (BW, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search 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: 2-(1H-INDAZOL-6-YLAMINO)-BENZAMIDE COMPOUNDS AS PROTEIN KINASES INHIBITORS USEFUL FOR THE TREATMENT OF OPHTALMIC DISEASES

(57) Abstract: Indazole compounds that modulate and/or inhibit the ophthalmic diseases and the activity of certain protein kinases are described. These compounds and pharmaceutical compositions containing them are capable of mediating tyrosine kinase signal transduction and thereby modulate and/or inhibit unwanted cell proliferation. The invention is also directed to the therapeutic or prophylactic use of pharmaceutical compositions containing such compounds, and to methods of treating ophthalmic diseases and cancer and other disease states associated with unwanted angiogenesis and/or cellular proliferation, such as diabetic retinopathy, neovascular glaucoma,rheumatoid arthritis, and psoriasis, by administering effective amounts of such compounds.

WO 2004/056806 A1

2-(1H-INDAZOL-6-YLAMINO)- BENZAMIDE COMPOUNDS AS PROTEIN KINASES INHIBITORS USEFUL FOR THE TREATMENT OF OPHTHALMIC DISEASES

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application No. 60/434,902, filed December 19, 2002, herein incorporated by reference in its entirety for all purposes.

FIELD OF THE INVENTION

This invention is directed to indazole compounds that mediate and/or inhibit ophthalmic diseases and the activity of certain protein kinases, and to pharmaceutical compositions containing such compounds. The invention is also directed to the therapeutic or prophylactic use of such compounds and compositions, and to methods of treating ophthalmic diseases and cancer as well as other disease states associated with unwanted angiogenesis and/or cellular proliferation, by administering effective amounts of such compounds.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Several diseases and conditions of the posterior segment of the eye threaten vision. Age related macular degeneration (ARMD or AMD), choroidal neovascularization (CNV), retinopathies (e.g., diabetic retinopathy, vitreoretinopathy, retinopathy of prematurity), retinitis (e.g., cytomegalovirus (CMV) retinitis), uveitis, macular edema, and glaucoma are several examples.

Age related macular degeneration (ARMD or AMD) is the leading cause of blindness in the elderly. ARMD attacks the center of vision and blurs it, making reading, driving, and other detailed tasks difficult or impossible. About 200,000 new cases of ARMD occur each year in the United States alone. Current estimates reveal that approximately forty percent of the population over age 75, and approximately twenty percent of the population over age 60, suffer from some degree of macular degeneration. "Wet" ARMD is the type of ARMD that most often causes blindness. In wet ARMD, newly formed choroidal blood vessels (choroidal neovascularization (CNV)) leak fluid and cause progressive damage to the retina. In the particular case of CNV in ARMD, two main methods of treatment are currently being developed, (a) photocoagulation and (b) the use of angiogenesis inhibitors.

However, photocoagulation can be harmful to the retina and is impractical when the CNV is in proximity of the fovea. Furthermore, photocoagulation often results in recurrent CNV over time. Oral administration of anti-angiogenic compounds is also being tested as a systemic treatment for ARMD. However, due to drug-specific metabolic restrictions, systemic administration usually provides sub-therapeutic drug levels to the

eye. Therefore, to achieve effective intraocular drug concentrations, either an unacceptably high dose or repetitive conventional doses are required. Various implants have also been developed for delivery of anti-angiogenic compounds locally to the eye. Examples of such implants are disclosed in U.S. Pat. Nos. 5,824,072 to Wong, U.S. Pat. No. 5,476,511 to Gwon et al., and U.S. Pat. No. 5,773,019 to Ashton et al., each of which is herein incorporated by reference in their entireties for all purposes.

Neovascular Diseases of the Eye

As noted above, the present invention also provides methods for treating neovascular diseases of the eye, including for example, corneal neovascularization, neovascular glaucoma, proliferative diabetic retinopathy, retrolental fibroblasia and macular degeneration.

Briefly, corneal neovascularization as a result of injury to the anterior segment is a significant cause of decreased visual acuity and blindness, and a major risk factor for rejection of corneal allografts. As described by Burger et al., Lab, Invest. 48:169-180, 1983, herein incorporated by reference in its entirety for all purposes, corneal angiogenesis involves three phases: a pre-vascular latent period, active neovascularization, and vascular maturation and regression. The identity and mechanism of various angiogenic factors, including elements of the inflammatory response, such as leukocytes, platelets, cytokines, and eicosanoids, or unidentified plasma constituents have yet to be revealed.

Currently no clinically satisfactory therapy exists for inhibition of corneal neovascularization or regression of existing corneal new vessels. Topical corticosteroids appear to have some clinical utility, presumably by limiting stromal inflammation.

Thus, within one aspect of the present invention methods are provided for treating neovascular diseases of the eye such as corneal neovascularization (including corneal graft neovascularization), comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of an anti-angiogenic composition (as described above) to the cornea, such that the formation of blood vessels is inhibited. Briefly, the cornea is a tissue which normally lacks blood vessels. In certain pathological conditions however, capillaries may extend into the cornea from the pericorneal vascular plexus of the limbus. When the cornea becomes vascularized, it also becomes clouded, resulting in a decline in the patient's visual acuity. Visual loss may become complete if the cornea completely opacitates.

Blood vessels can enter the cornea in a variety of patterns and depths, depending upon the process which incites the neovascularization. These patterns have been traditionally defined by ophthalmologists in the following types: pannus trachomatosus, pannus leprosus, pannus phlyctenulosus, pannus degenerativus, and glaucomatous

pannus. The corneal stroma may also be invaded by branches of the anterior ciliary artery (called interstitial vascularization) which causes several distinct clinical lesions: terminal loops, a "brush-like" pattern, an umbel form, a lattice form, interstitial arcades (from episcleral vessels), and aberrant irregular vessels.

A wide variety of disorders can result in corneal neovascularization, including for example, corneal infections (e.g., trachoma, herpes simplex keratitis, leishmaniasis and onchocerciasis), immunological processes (e.g., graft rejection and Stevens-Johnson's syndrome), alkali burns, trauma, inflammation (of any cause), toxic and nutritional deficiency states, and as a complication of wearing contact lenses.

While the cause of corneal neovascularization may vary, the response of the cornea to the insult and the subsequent vascular ingrowth is similar regardless of the cause. Briefly, the location of the injury appears to be of importance as only those lesions situated within a critical distance of the limbus will incite an angiogenic response. This is likely due to the fact that the angiogenic factors responsible for eliciting the vascular invasion are created at the site of the lesion, and must diffuse to the site of the nearest blood vessels (the limbus) in order to exert their effect. Past a certain distance from the limbus, this would no longer be possible and the limbic endothelium would not be induced to grow into the cornea. Several angiogenic factors are likely involved in this process, many of which are products of the inflammatory response. Indeed, neovascularization of the cornea appears to only occur in association with an inflammatory cell infiltrate, and the degree of angiogenesis is proportional to the extent of the inflammatory reaction. Corneal edema further facilitates blood vessel ingrowth by loosening the corneal stromal framework and providing a pathway of "least resistance" through which the capillaries can grow.

Following the initial inflammatory reaction, capillary growth into the cornea proceeds in the same manner as it occurs in other tissues. The normally quiescent endothelial cells of the limbic capillaries and venules are stimulated to divide and migrate. The endothelial cells project away from their vessels of origin, digest the surrounding basement membrane and the tissue through which they will travel, and migrate towards the source of the angiogenic stimulus. The blind ended sprouts acquire a lumen and then anastomose together to form capillary loops. The end result is the establishment of a vascular plexus within the corneal stroma.

Anti-angiogenic factors and compositions of the present invention are useful by blocking the stimulatory effects of angiogenesis promoters, reducing endothelial cell division, decreasing endothelial cell migration, and impairing the activity of the proteolytic enzymes secreted by the endothelium.

SUMMARY OF THE INVENTION

Within particularly preferred embodiments of the invention, an anti-angiogenic factor may be prepared for topical administration in saline (combined with any of the preservatives and antimicrobial agents commonly used in ocular preparations), and administered in eyedrop form. The anti-angiogenic factor solution or suspension may be prepared in its pure form and administered several times daily. Alternatively, anti-angiogenic compositions, prepared as described above, may also be administered directly to the cornea.

Within preferred embodiments, the anti-angiogenic composition is prepared with a muco-adhesive polymer which binds to cornea. Within further embodiments, the anti-angiogenic factors or anti-angiogenic compositions may be utilized as an adjunct to conventional steroid therapy.

Topical therapy may also be useful prophylactically in corneal lesions which are known to have a high probability of inducing an angiogenic response (such as chemical burns). In these instances the treatment, likely in combination with steroids, may be instituted immediately to help prevent subsequent complications.

Within other embodiments, the anti-angiogenic compositions described above may be injected directly into the corneal stroma by an ophthalmologist under microscopic guidance. The preferred site of injection may vary with the morphology of the individual lesion, but the goal of the administration would be to place the composition at the advancing front of the vasculature (i.e., interspersed between the blood vessels and the normal cornea). In most cases this would involve perilimbic corneal injection to "protect" the cornea from the advancing blood vessels. This method may also be utilized shortly after a corneal insult in order to prophylactically prevent corneal neovascularization. In this situation the material could be injected in the perilimbic cornea interspersed between the corneal lesion and its undesired potential limbic blood supply. Such methods may also be utilized in a similar fashion to prevent capillary invasion of transplanted corneas. In a sustained-release form injections might only be required 2-3 times per year. Asteroid could also be added to the injection solution to reduce inflammation resulting from the injection itself.

Within another aspect of the present invention, methods are provided for treating neovascular glaucoma, comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of an anti-angiogenic composition to the eye, such that the formation of blood vessels is inhibited.

Briefly, neovascular glaucoma is a pathological condition wherein new capillaries develop in the iris of the eye. The angiogenesis usually originates from vessels located at the pupillary margin, and progresses across the root of the iris and into the trabecular

meshwork. Fibroblasts and other connective tissue elements are associated with the capillary growth and a fibrovascular membrane develops which spreads across the anterior surface of the iris. Eventually this tissue reaches the anterior chamber angle where it forms synechiae. These synechiae in turn coalesce, scar, and contract to ultimately close off the anterior chamber angle. The scar formation prevents adequate drainage of aqueous humor through the angle and into the trabecular meshwork, resulting in an increase in intraocular pressure that may result in blindness.

Neovascular glaucoma generally occurs as a complication of diseases in which retinal ischemia is predominant. In particular, about one third of the patients with this disorder have diabetic retinopathy and 28% have central retinal vein occlusion. Other causes include chronic retinal detachment, end-stage glaucoma, carotid artery obstructive disease, retrolental fibroplasia, sickle-cell anemia, intraocular tumors, and carotid cavernous fistulas. In its early stages, neovascular glaucoma may be diagnosed by high magnification slitlamp biomicroscopy, where it reveals small, dilated, disorganized capillaries (which leak fluorescein) on the surface of the iris. Later gonioscopy demonstrates progressive obliteration of the anterior chamber angle by fibrovascular bands. While the anterior chamber angle is still open, conservative therapies may be of assistance. However, once the angle closes surgical intervention is required in order to alleviate the pressure.

Therefore, within one embodiment of the invention anti-angiogenic factors (either alone or in an anti-angiogenic composition, as described above) may be administered topically to the eye in order to treat early forms of neovascular glaucoma.

Within other embodiments of the invention, anti-angiogenic compositions may be implanted by injection of the composition into the region of the anterior chamber angle. This provides a sustained localized increase of anti-angiogenic factor, and prevents blood vessel growth into the area. Implanted or injected anti-angiogenic compositions which are placed between the advancing capillaries of the iris and the anterior chamber angle can "defend" the open angle from neovascularization. As capillaries will not grow within a significant radius of the anti-angiogenic composition, patency of the angle could be maintained. Within other embodiments, the anti-angiogenic composition may also be placed in any location such that the anti-angiogenic factor is continuously released into the aqueous humor. This would increase the anti-angiogenic factor concentration within the humor, which in turn bathes the surface of the iris and its abnormal capillaries, thereby providing another mechanism by which to deliver the medication. These therapeutic modalities may also be useful prophylactically and in combination with existing treatments.

Within another aspect of the present invention, methods are provided for treating proliferative diabetic retinopathy, comprising the step of administering to a patient a

therapeutically effective amount of an anti-angiogenic composition to the eyes, such that the formation of blood vessels is inhibited.

Briefly, the pathology of diabetic retinopathy is thought to be similar to that described above for neovascular glaucoma. In particular, background diabetic retinopathy is believed to convert to proliferative diabetic retinopathy under the influence of retinal hypoxia. Generally, neovascular tissue sprouts from the optic nerve (usually within 10 mm of the edge), and from the surface of the retina in regions where tissue perfusion is poor. Initially the capillaries grow between the inner limiting membrane of the retina and the posterior surface of the vitreous. Eventually, the vessels grow into the vitreous and through the inner limiting membrane. As the vitreous contracts, traction is applied to the vessels, often resulting in shearing of the vessels and blinding of the vitreous due to hemorrhage. Fibrous traction from scarring in the retina may also produce retinal detachment.

The conventional therapy of choice is panretinal photocoagulation to decrease retinal tissue, and thereby decrease retinal oxygen demands. Although initially effective, there is a high relapse rate with new lesions forming in other parts of the retina. Complications of this therapy include a decrease in peripheral vision of up to 50% of patients, mechanical abrasions of the cornea, laser-induced cataract formation, acute glaucoma, and stimulation of subretinal neovascular growth (which can result in loss of vision). As a result, this procedure is performed only when several risk factors are present, and the risk-benefit ratio is clearly in favor of intervention.

Therefore, within particularly preferred embodiments of the invention, proliferative diabetic retinopathy may be treated by injection of an anti-angiogenic factor(s) (or anti-angiogenic composition) into the aqueous humor or the vitreous, in order to increase the local concentration of anti-angiogenic factor in the retina. Preferably, this treatment should be initiated prior to the acquisition of severe disease requiring photocoagulation. Within other embodiments of the invention, arteries which feed the neovascular lesions may be embolized (utilizing anti-angiogenic compositions, as described above)

Within another aspect of the present invention, methods are provided for treating retrolental fibroblasia, comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of an anti-angiogenic factor (or anti-angiogenic composition) to the eye, such that the formation of blood vessels is inhibited.

Briefly, retrolental fibroblasia is a condition occurring in premature infants who receive oxygen therapy. The peripheral retinal vasculature, particularly on the temporal side, does not become fully formed until the end of fetal life. Excessive oxygen (even levels which would be physiologic at term) and the formation of oxygen free radicals are thought to be important by causing damage to the blood vessels of the immature retina.

These vessels constrict, and then become structurally obliterated on exposure to oxygen. As a result, the peripheral retina fails to vascularize and retinal ischemia ensues. In response to the ischemia, neovascularization is induced at the junction of the normal and the ischemic retina.

In 75% of the cases these vessels regress spontaneously. However, in the remaining 25% there is continued capillary growth, contraction of the fibrovascular component, and traction on both the vessels and the retina. This results in vitreous hemorrhage and/or retinal detachment which can lead to blindness. Neovascular angle-closure glaucoma is also a complication of this condition.

As it is often impossible to determine which cases will spontaneously resolve and which will progress in severity, conventional treatment (i.e., surgery) is generally initiated only in patients with established disease and a well developed pathology. This "wait and see" approach precludes early intervention, and allows the progression of disease in the 25% who follow a complicated course. Therefore, within one embodiment of the invention, topical administration of anti-angiogenic factors (or anti-angiogenic compositions, as described above) may be accomplished in infants which are at high risk for developing this condition in an attempt to cut down on the incidence of progression of retrolental fibroplasia. Within other embodiments, intravitreous injections and/or intraocular implants of an anti-angiogenic composition may be utilized. Such methods are particularly preferred in cases of established disease, in order to reduce the need for surgery.

Protein Kinases

Protein kinases are a family of enzymes that catalyze phosphorylation of the hydroxyl group of specific tyrosine, serine, or threonine residues in proteins. Typically, such phosphorylation dramatically perturbs the function of the protein, and thus protein kinases are pivotal in the regulation of a wide variety of cellular processes, including metabolism, cell proliferation, cell differentiation, and cell survival. Of the many different cellular functions in which the activity of protein kinases is known to be required, some processes represent attractive targets for therapeutic intervention for certain disease states. Two examples are angiogenesis and cell-cycle control, in which protein kinases play a pivotal role; these processes are essential for the growth of solid tumors as well as for other diseases.

Angiogenesis is the mechanism by which new capillaries are formed from existing vessels. When required, the vascular system has the potential to generate new capillary networks in order to maintain the proper functioning of tissues and organs. In the adult, however, angiogenesis is fairly limited, occurring only in the process of wound healing and neovascularization of the endometrium during menstruation. See Merenmies et al., *Cell Growth & Differentiation*, 8, 3-10 (1997), herein incorporated by reference in its entirety for

all purposes. On the other hand, unwanted angiogenesis is a hallmark of several diseases, such as retinopathies, psoriasis, rheumatoid arthritis, age-related macular degeneration (AMD), and cancer (solid tumors). Folkman, *Nature Med.*, 1, 27-31 (1995), herein incorporated by reference in its entirety for all purposes. Protein kinases which have been shown to be involved in the angiogenic process include three members of the growth factor receptor tyrosine kinase family: VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, also known as KDR (kinase insert domain receptor) and as FLK-1); FGF-R (fibroblast growth factor receptor); and TEK (also known as Tie-2).

VEGF-R2, which is expressed only on endothelial cells, binds the potent angiogenic growth factor VEGF and mediates the subsequent signal transduction through activation of its intracellular kinase activity. Thus, it is expected that direct inhibition of the kinase activity of VEGF-R2 will result in the reduction of angiogenesis even in the presence of exogenous VEGF (see Strawn et al., *Cancer Research*, 56, 3540-3545 (1996)), as has been shown with mutants of VEGF-R2 which fail to mediate signal transduction. Millauer et al., *Cancer Research*, 56, 1615-1620 (1996). Furthermore, VEGF-R2 appears to have no function in the adult beyond that of mediating the angiogenic activity of VEGF. Therefore, a selective inhibitor of the kinase activity of VEGF-R2 would be expected to exhibit little toxicity.

Similarly, FGF-R binds the angiogenic growth factors aFGF and bFGF and mediates subsequent intracellular signal transduction. Recently, it has been suggested that growth factors such as bFGF may play a critical role in inducing angiogenesis in solid tumors that have reached a certain size. Yoshiji et al., *Cancer Research*, 57, 3924-3928 (1997). Unlike VEGF-R2, however, FGF-R is expressed in a number of different cell types throughout the body and may or may not play important roles in other normal physiological processes in the adult. Nonetheless, systemic administration of a small-molecule inhibitor of the kinase activity of FGF-R has been reported to block bFGF-induced angiogenesis in mice without apparent toxicity. Mohammad et al., *EMBO Journal*, 17, 5996-5904 (1998).

TEK (also known as Tie-2) is another receptor tyrosine kinase expressed only on endothelial cells which has been shown to play a role in angiogenesis. The binding of the factor angiopoietin-1 results in autophosphorylation of the kinase domain of TEK and results in a signal transduction process which appears to mediate the interaction of endothelial cells with peri-endothelial support cells, thereby facilitating the maturation of newly formed blood vessels. The factor angiopoietin-2, on the other hand, appears to antagonize the action of angiopoietin-1 on TEK and disrupts angiogenesis. Maisonpierre et al., *Science*, 277, 55-60 (1997).

As a result of the above-described developments, it has been proposed to treat angiogenesis by the use of compounds inhibiting the kinase activity of VEGF-R2, FGF-R, and/or TEK. For example, WIPO International Publication No. WO 97/34876 discloses certain cinnoline derivatives that are inhibitors of VEGF-R2, which may be used for the treatment of disease states associated with abnormal angiogenesis and/or increased vascular permeability such as cancer, diabetes, psoriasis, rheumatoid arthritis, Kaposi's sarcoma, haemangioma, acute and chronic nephropathies, atheroma, arterial restinosis, autoimmune diseases, acute inflammation, and ocular diseases with retinal vessel proliferation.

Phosphorylase kinase activates glycogen phosphorylase, thus increasing glycogen breakdown and hepatic glucose release. Hepatic glucose production is disregulated in type 2 diabetes, and is the primary cause of fasting hyperglycemia, which results in many of the secondary complications afflicting these patients. Thus, reduction in glucose release from the liver would lower elevated plasma glucose levels. Inhibitors of phosphorylase kinase should therefore decrease phosphorylase activity and glycogenolysis, thus reducing hyperglycemia in patients.

Another physiological response to VEGF is vascular hyperpermeability, which has been proposed to play a role in the early stages of angiogenesis. In ischemic tissues, such as those occurring in the brain of stroke victims, hypoxia trigger VEGF expression, leading to increased vascular permeability and ultimately edema in the surrounding tissues. In a rat model for stroke, it has been shown by van Bruggen et al., *J. Clinical Invest.*, 104, 1613-20 (1999) that administration of a monoclonal antibody to VEGF reduces the infarct volume. Thus, inhibitors of VEGFR are anticipated to be useful for the treatment of stroke.

In addition to its role in angiogenesis, protein kinases also play a crucial role in cell-cycle control. Uncontrolled cell proliferation is the insignia of cancer. Cell proliferation in response to various stimuli is manifested by a de-regulation of the cell division cycle, the process by which cells multiply and divide. Tumor cells typically have damage to the genes that directly or indirectly regulate progression through the cell division cycle.

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are serine-threonine protein kinases that play critical roles in regulating the transitions between different phases of the cell cycle. See, e.g., the articles compiled in *Science*, 274, 1643-1677 (1996). CDK complexes are formed through association of a regulatory cyclin subunit (e.g., cyclin A, B1, B2, D1, D2, D3, and E) and a catalytic kinase subunit (e.g., cdc2 (CDK1), CDK2, CDK4, CDK5, and CDK6). As the name implies, the CDKs display an absolute dependence on the cyclin subunit in order to phosphorylate their target substrates, and different kinase/cyclin pairs function to regulate progression through specific phases of the cell cycle.

It is CDK4 complexed to the D cyclins that plays a critical part in initiating the cell-division cycle from a resting or quiescent stage to one in which cells become committed to cell division. This progression is subject to a variety of growth regulatory mechanisms, both negative and positive. Aberrations in this control system, particularly those that affect the function of CDK4, have been implicated in the advancement of cells to the highly proliferative state characteristic of malignancies, particularly familial melanomas, esophageal carcinomas, and pancreatic cancers. See, e.g., Kamb, *Trends in Genetics*, 11, 136-140 (1995); Kamb et al., *Science*, 264, 436-440 (1994).

Myriad publications describe a variety of chemical compounds useful against a variety of therapeutic targets. For example, WIPO International Publication Nos. WO 99/23077 and WO 99/23076 describe indazole-containing compounds having phosphodiesterase type IV inhibitory activity produced by an indazole-for-catechol bioisostere replacement. U.S. Patent No. 5,760,028 discloses heterocycles including 3-[1-[3-(imidazolin-2-ylamino)propyl]indazol-5-ylcarbonylamino]-2-(benzyloxycarbonylamino)propionic acid, which are useful as antagonists of the $\alpha_v\beta_3$ integrin and related cell surface adhesive protein receptors. WIPO International Publication No. WO 98/09961 discloses certain indazole derivatives and their use as inhibitors of phosphodiesterase (PDE) type IV or the production of tumor necrosis factor (TNF) in a mammal. Recent additions to the virtual library of known compounds include those described as being anti-proliferative therapeutic agents that inhibit CDKs. For example, U.S. Patent No. 5,621,082 to Xiong et al. discloses nucleic acid encoding an inhibitor of CDK8, and European Patent Publication No. 0 666 270 A2 describes peptides and peptide mimetics that act as inhibitors of CDK1 and CDK2. WIPO International Publication No. WO 97/16447 discloses certain analogs of chromones that are inhibitors of cyclin-dependent kinases, in particular of CDK/cyclin complexes such as CDK4/cyclin D1, which may be used for inhibiting excessive or abnormal cell proliferation, and therefore for treating cancer. WIPO International Publication No. WO 99/21845 describes 4-aminothiazole derivatives that are useful as CDK inhibitors. Each of the above listed patents and/or application is herein incorporated by reference in their entireties for all purposes.

There is still a need, however, for small-molecule compounds that may be readily synthesized and are effective in inhibiting one or more CDKs or CDK/cyclin complexes. Because CDK4 may serve as a general activator of cell division in most cells, and complexes of CDK4 and D-type cyclins govern the early G_1 phase of the cell cycle, there is a need for effective inhibitors of CDK4, and D-type cyclin complexes thereof, for treating one or more types of tumors. Also, the pivotal roles of cyclin E/CDK2 and cyclin B/CDK1

kinases in the G_1/S phase and G_2/M transitions, respectively, offer additional targets for therapeutic intervention in suppressing deregulated cell-cycle progression in cancer.

Another protein kinase, CHK1, plays an important role as a checkpoint in cell-cycle progression. Checkpoints are control systems that coordinate cell-cycle progression by influencing the formation, activation and subsequent inactivation of the cyclin-dependent kinases. Checkpoints prevent cell-cycle progression at inappropriate times, maintain the metabolic balance of cells while the cell is arrested, and in some instances can induce apoptosis (programmed cell death) when the requirements of the checkpoint have not been met. See, e.g., O'Connor, *Cancer Surveys*, 29, 151-182 (1997); Nurse, *Cell*, 91, 865-867 (1997); Hartwell et al., *Science*, 266, 1821-1828 (1994); Hartwell et al., *Science*, 246, 629-634 (1989).

One series of checkpoints monitors the integrity of the genome and, upon sensing DNA damage, these "DNA damage checkpoints" block cell-cycle progression in G_1 and G_2 phases, and slow progression through S phase. O'Connor, *Cancer Surveys*, 29, 151-182 (1997); Hartwell et al., *Science*, 266, 1821-1828 (1994). This action enables DNA repair processes to complete their tasks before replication of the genome and subsequent separation of this genetic material into new daughter cells takes place. Importantly, the most commonly mutated gene in human cancer, the p53 tumor suppressor gene, produces a DNA damage checkpoint protein that blocks cell-cycle progression in G_1 phase and/or induces apoptosis (programmed cell death) following DNA damage. Hartwell et al., *Science*, 266, 1821-1828 (1994). The p53 tumor suppressor has also been shown to strengthen the action of a DNA damage checkpoint in G_2 phase of the cell cycle. See, e.g., Bunz et al., *Science*, 28, 1497-1501 (1998); Winters et al., *Oncogene*, 17, 673-684 (1998); Thompson, *Oncogene*, 15, 3025-3035 (1997).

Given the pivotal nature of the p53 tumor suppressor pathway in human cancer, therapeutic interventions that exploit vulnerabilities in p53-defective cancer have been actively sought. One emerging vulnerability lies in the operation of the G_2 checkpoint in p53 defective cancer cells. Cancer cells, because they lack G_1 checkpoint control, are particularly vulnerable to abrogation of the last remaining barrier protecting them from the cancer-killing effects of DNA-damaging agents: the G_2 checkpoint. The G_2 checkpoint is regulated by a control system that has been conserved from yeast to humans. Important in this conserved system is a kinase, CHK1, which transduces signals from the DNA-damage sensory complex to inhibit activation of the cyclin B/Cdc2 kinase, which promotes mitotic entry. See, e.g., Peng et al., *Science*, 277, 1501-1505 (1997); Sanchez et al., *Science*, 277, 1497-1501 (1997). Inactivation of CHK1 has been shown to both abrogate G_2 arrest induced by DNA damage inflicted by either anticancer agents or endogenous DNA damage, as well as result in preferential killing of the resulting checkpoint defective

cells. See, e.g., Nurse, *Cell*, 91, 865-867 (1997); Weinert, *Science*, 277, 1450-1451 (1997); Walworth et al., *Nature*, 383, 368-371 (1993); and Al-Khodairy et al., *Molec. Biol. Cell*, 5, 147-160 (1994).

Selective manipulation of checkpoint control in cancer cells could afford broad utilization in cancer chemotherapeutic and radiotherapy regimens and may, in addition, offer a common hallmark of human cancer "genomic instability" to be exploited as the selective basis for the destruction of cancer cells. A number of factors place CHK1 as a pivotal target in DNA-damage checkpoint control. The elucidation of inhibitors of this and functionally related kinases such as Cds1/CHK2, a kinase recently discovered to cooperate with CHK1 in regulating S phase progression (see Zeng et al., *Nature*, 395, 507-510 (1998); Matsuoka, *Science*, 282, 1893-1897 (1998)), could provide valuable new therapeutic entities for the treatment of cancer.

Integrin receptor binding to ECM initiates intracellular signals mediated by FAK (Focal Adhesion Kinase) that are involved in cell motility, cellular proliferation, and survival. In human cancers, FAK overexpression is implicated in tumorigenesis and metastatic potential through its role in integrin mediated signaling pathways.

Tyrosine kinases can be of the receptor type (having extracellular, transmembrane and intracellular domains) or the non-receptor type (being wholly intracellular). At least one of the non-receptor protein tyrosine kinases, namely, LCK, is believed to mediate the transduction in T-cells of a signal from the interaction of a cell-surface protein (Cd4) with a cross-linked anti-Cd4 antibody. A more detailed discussion of non-receptor tyrosine kinases is provided in Bolen, *Oncogene*, 8, 2025-2031 (1993), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.

In addition to the protein kinases identified above, many other protein kinases have been considered to be therapeutic targets, and numerous publications disclose inhibitors of kinase activity, as reviewed in the following: United States Patent No. 6,534,524, issued March 18, 2003, United States Patent No. 6,531,491, issued March 11, 2003, PCT International patent application publication number WO 00/38685 (published July 6, 2001), PCT International patent application publication number WO 97/49688 (published December 31, 1997), PCT International patent application publication number WO 98/23613 (published June 4, 1998), United States Patent No. 6,071,935 issued June 6, 2000, PCT International patent application publication number WO 96/30347 (published October 3, 1996), PCT International patent application publication number WO 96/40142 (published December 19, 1996), PCT International patent application publication number WO 97/13771 (published April 17, 1997), PCT International patent application publication number WO 95/23141 (published August 31, 1995), PCT International patent application publication number WO 03/006059 (published January 23, 2003), PCT International

patent application publication number WO 03/035047 (published May 1, 2003), PCT international patent application publication number WO 02/064170 (published August 22, 2002), PCT international patent application publication number WO 02/41882 (published May 30, 2002), PCT international patent application publication number WO 02/30453 (published April 18, 2002), PCT international patent application publication number WO 01/85796 (published November 15, 2001), PCT international patent application publication number WO 01/74360 (published October 11, 2001), PCT international patent application publication number WO 01/74296 (published October 11, 2001), PCT international patent application publication number WO 01/70268 (published September 27, 2001), European patent application publication number EP 1086705 (published March 28, 2001), and PCT international patent application publication number WO 98/51344 (published November 19, 1998). The foregoing patents and applications are each incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.

There is still a need, however, for effective inhibitors of protein kinases. Moreover, as is understood by those skilled in the art, it is desirable for kinase inhibitors to possess both high affinity for the target kinase or kinases as well as high selectivity versus other protein kinases.

Thus, an objective of the invention is to discover potent agents for the treatment of ophthalmic diseases, such as age related macular degeneration (ARMD), choroidal neovascularization (CNV), retinopathies (e.g., diabetic retinopathy, vitreoretinopathy, retinopathy of prematurity), retinitis (e.g., cytomegalovirus (CMV) retinitis), uveitis, macular edema, and glaucoma.

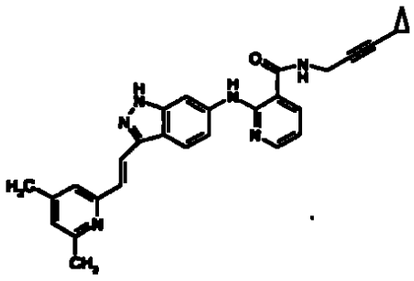
Another objective of the present invention is to discover potent inhibitors of protein kinases.

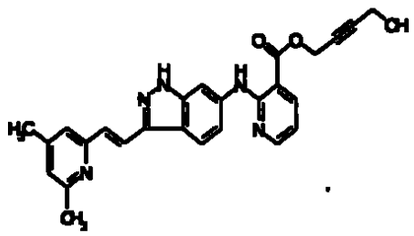
Another objective of the invention is to discover effective kinase inhibitors having a strong and selective affinity for one or more particular kinases.

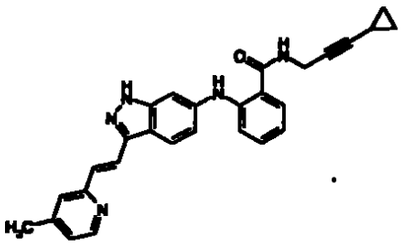
These and other objectives of the invention, which will become apparent from the following description, have been achieved by the discovery of the indazole compounds, pharmaceutically acceptable prodrugs, pharmaceutically active metabolites, and pharmaceutically acceptable salts thereof (such compounds, prodrugs, metabolites and salts are collectively referred to as "agents") described below, which modulate and/or inhibit the activity of protein kinases. Pharmaceutical compositions containing such agents are useful in treating diseases mediated by kinase activity, such as cancer, as well as other disease states associated with unwanted angiogenesis and/or cellular proliferation, such as diabetic retinopathy, neovascular glaucoma, rheumatoid arthritis, and psoriasis. Further, the agents have advantageous properties relating to the

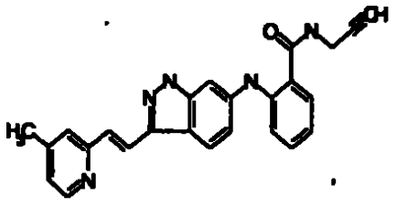
modulation and/or inhibition of the kinase activity associated with VEGF-R, FGF-R, CDK complexes, CHK1, LCK, TEK, FAK, and/or phosphorylase kinase.

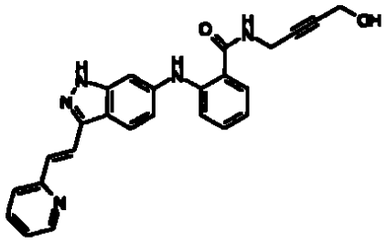
In a general aspect, the invention relates to compounds having the following structures:

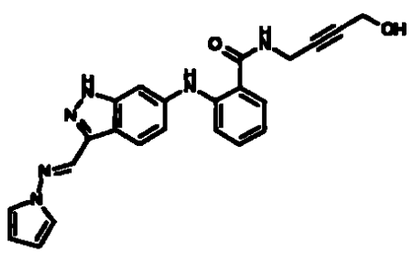


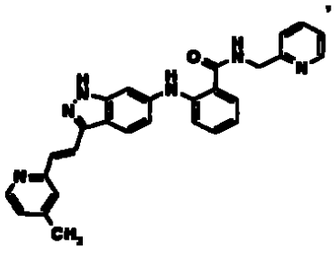


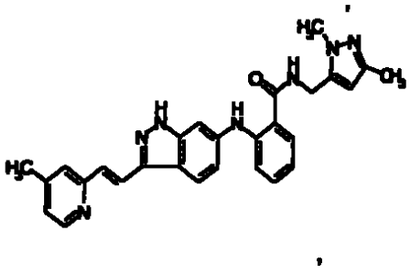


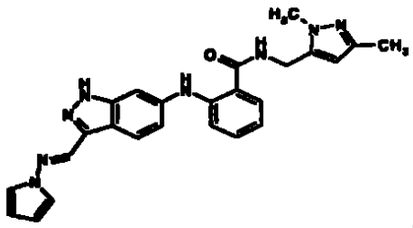


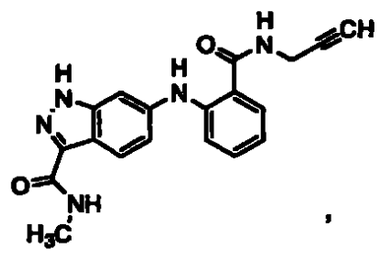


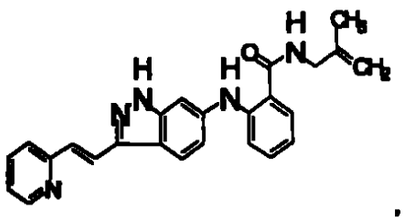


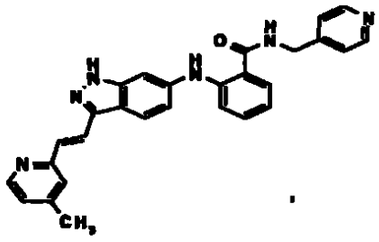


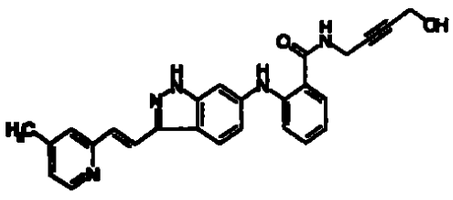


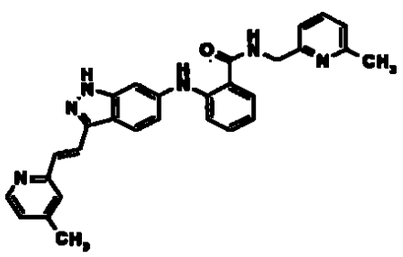


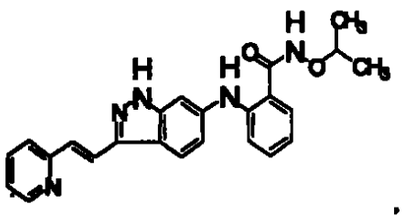


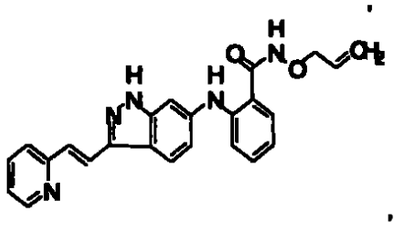


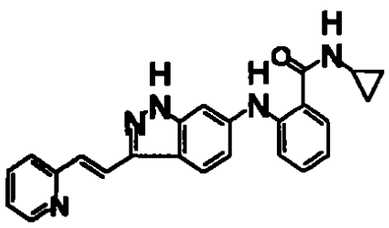


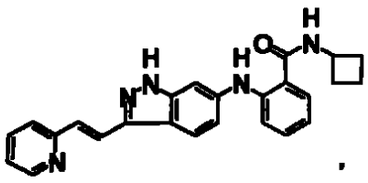


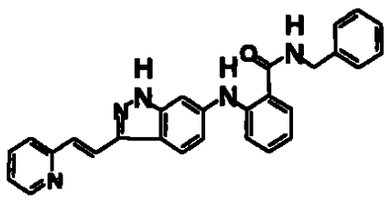


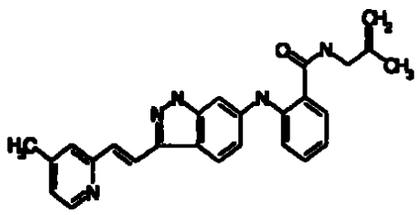


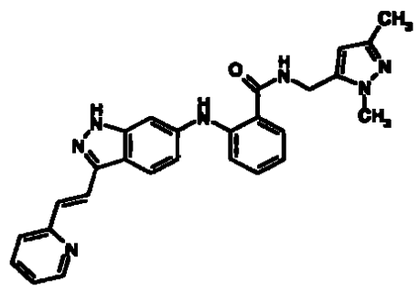


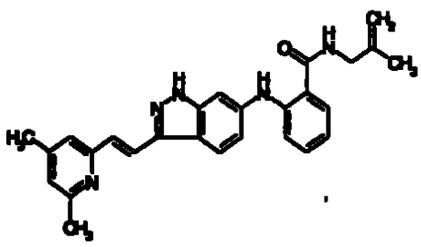


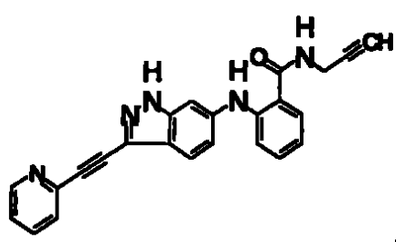


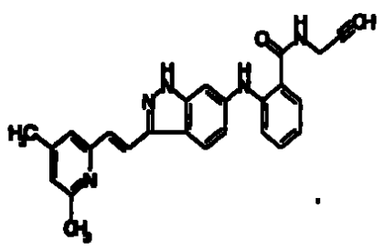


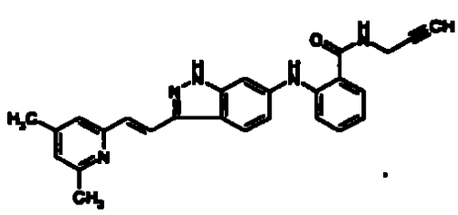


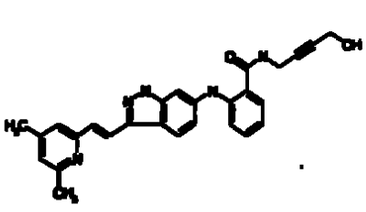


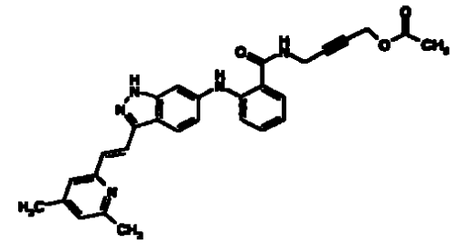


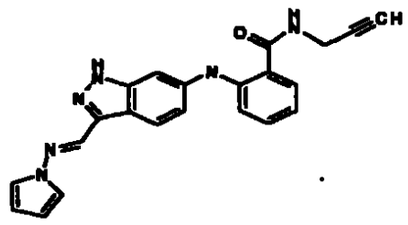


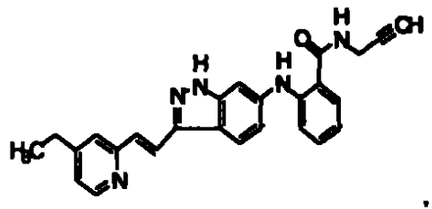


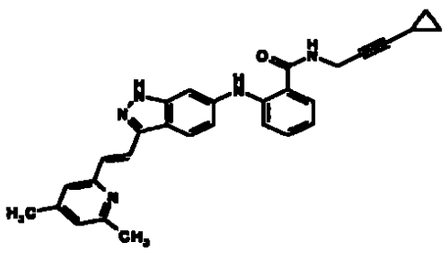


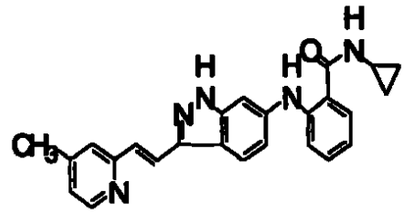


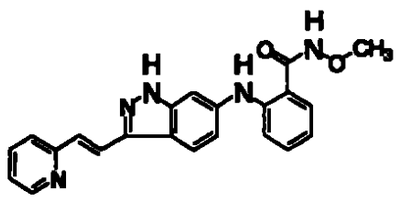


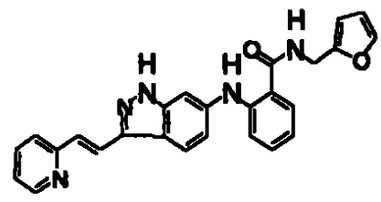


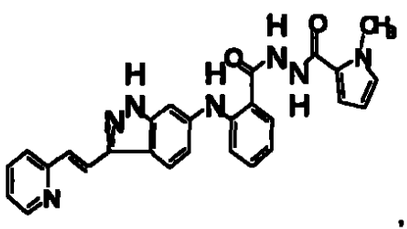


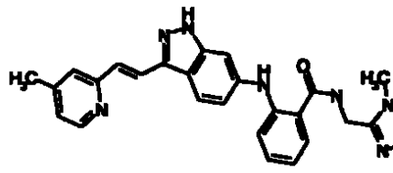


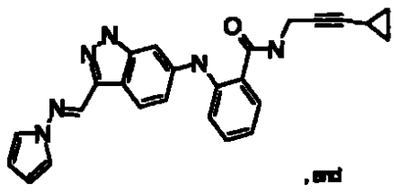


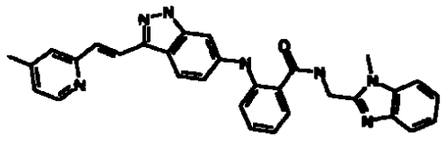












, and

The invention also relates to a method of modulating and/or inhibiting the kinase activity of VEGF-R, FGF-R, a CDK complex, CHK1, LCK, TEK, FAK, and/or phosphorylase kinase by administering a compound of the Formula I, II, III, or IV, or a

pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt thereof. Preferred compounds of the present invention that have selective kinase activity—i.e., they possess significant activity against one or more specific kinases while possessing less or minimal activity against one or more different kinases. In one preferred embodiment of the invention, compounds of the present invention are those of Formula I possessing substantially higher potency against VEGF receptor tyrosine kinase than against FGF-R1 receptor tyrosine kinase. The invention is also directed to methods of modulating VEGF receptor tyrosine kinase activity without significantly modulating FGF receptor tyrosine kinase activity.

The inventive compounds may be used advantageously in combination with other known therapeutic agents. For example, compounds of Formula I, II, III, or IV which possess antiangiogenic activity may be co-administered with cytotoxic chemotherapeutic agents, such as taxol, taxotere, vinblastine, cis-platin, doxorubicin, adriamycin, and the like, to produce an enhanced antitumor effect. Additive or synergistic enhancement of therapeutic effect may also be obtained by co-administration of compounds of Formula I, II, III, or IV which possess antiangiogenic activity with other antiangiogenic agents, such as combretastatin A-4, endostatin, prinomastat, celecoxib, rofocoxib, EMD121974, IM862, anti-VEGF monoclonal antibodies, and anti-KDR monoclonal antibodies. Additional combinations are exemplified in WO. 0038716, WO 00387171, WO 0038715, WO 0038730, WO 0038718, Wo 0038665, WO 0037107, WO 0038786, WO 0038719, all concurrently filed on December 22, 1999, herein incorporated by reference in their entireties for all purposes.

The invention also relates pharmaceutical compositions, each comprising an effective amount of an agent selected from compounds of Formula I and pharmaceutically acceptable salts, pharmaceutically active metabolites, and pharmaceutically acceptable prodrugs thereof; and a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle for such agent. The invention further provides methods of treating ophthalmic diseases/conditions and cancer as well as other disease states associated with unwanted angiogenesis and/or cellular proliferation, comprising administering effective amounts of such an agent to a patient in need of such treatment.

The inventive compounds of the Formula I, II, III, and IV are useful for treating ophthalmic diseases and mediating the activity of protein kinases. More particularly, the compounds are useful as anti-angiogenesis agents and as agents for modulating and/or inhibiting the activity of protein kinases, thus providing treatments for ophthalmic diseases and cancer or other diseases associated with cellular proliferation mediated by protein kinases.

The term "alkyl" as used herein refers to straight- and branched-chain alkyl groups having one to twelve carbon atoms. Exemplary alkyl groups include methyl (Me), ethyl (Et), n-propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl (t-Bu), pentyl, isopentyl, tert-pentyl, hexyl, isohexyl, and the like. The term "lower alkyl" designates an alkyl having from 1 to 8 carbon atoms (a C_{1-8}-alkyl). Suitable substituted alkyls include fluoromethyl, difluoromethyl, trifluoromethyl, 2-fluoroethyl, 3-fluoropropyl, hydroxymethyl, 2-hydroxyethyl, 3-hydroxypropyl, and the like.

The term "alkylidene" refers to a divalent radical having one to twelve carbon atoms. Illustrative alkylidene groups include CH_2, $CHCH_3$, $(CH_3)_2$, and the like.

The term "alkenyl" refers to straight- and branched-chain alkenyl groups having from two to twelve carbon atoms. Illustrative alkenyl groups include prop-2-enyl, but-2-enyl, but-3-enyl, 2-methylprop-2-enyl, hex-2-enyl, and the like.

The term "alkynyl" refers to straight- and branched-chain alkynyl groups having from two to twelve carbon atoms.

The term "cycloalkyl" refers to saturated or partially unsaturated carbocycles having from three to twelve carbon atoms, including bicyclic and tricyclic cycloalkyl structures. Suitable cycloalkyls include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, and the like.

A "heterocycloalkyl" group is intended to mean a saturated or partially unsaturated monocyclic radical containing carbon atoms, preferably 4 or 5 ring carbon atoms, and at least one heteroatom selected from nitrogen, oxygen and sulfur.

The terms "aryl" and "heteroaryl" refer to monocyclic and polycyclic unsaturated or aromatic ring structures, with "aryl" referring to those that are carbocycles and "heteroaryl" referring to those that are heterocycles. Examples of aromatic ring structures include phenyl, naphthyl, 1,2,3,4-tetrahydronaphthyl, furyl, thienyl, pyrrolyl, pyridinyl, pyrazolyl, imidazolyl, pyrazinyl, pyridazinyl, 1,2,3-triazinyl, 1,2,4-oxadiazolyl, 1,3,4-oxadiazolyl, 1-H-tetrazol-5-yl, indolyl, quinolinyl, benzofuranyl, benzothiophenyl (thianaphthenyl), and the like. Such moieties may be optionally substituted by a fused-ring structure or bridge, for example OCH_2O.

The term "alkoxy" is intended to mean the radical –O-alkyl. Illustrative examples include methoxy, ethoxy, propoxy, and the like.

The term "aryloxy" respresents –O—aryl, wherein aryl is defined above.

The term "cycloalkoxyl" represents –O—cycloalkyl, wherein cycloalkyl is defined above.

The term "halogen" represents chlorine, fluorine, bromine or iodine. The term "halo" represents chloro, fluoro, bromo or iodo.

In general, the various moieties or functional groups for variables in the formulae may be optionally substituted by one or more suitable substituents. Exemplary substituents include

a halogen (F, Cl, Br, or I), lower alkyl, -OH, -NO_2, -CN, -CO_2H, -O-lower alkyl, -aryl, -aryl-lower alkyl, -CO_2CH_3, -$CONH_2$, -OCH_2CONH_2, -NH_2, -SO_2NH_2, haloalkyl (e.g., -CF_3, -CH_2CF_3), -O-haloalkyl (e.g., -OCF_3, -$OCHF_2$), and the like.

The terms "comprising" and "including" are used in an open, non-limiting sense.

It is understood that while a compound of Formula I may exhibit the phenomenon of tautomerism, the formula drawings within this specification expressly depict only one of the possible tautomeric forms. It is therefore to be understood that within the invention the formulae are intended to represent any tautomeric form of the depicted compound and is not to be limited merely to a specific tautomeric form depicted by the formula drawings.

Some of the inventive compounds may exist as single stereoisomers (i.e., essentially free of other stereoisomers), racemates, and/or mixtures of enantiomers and/or diastereomers. All such single stereoisomers, racemates and mixtures thereof are intended to be within the scope of the present invention. Preferably, the inventive compounds that are optically active are used in optically pure form.

As generally understood by those skilled in the art, an optically pure compound having one chiral center is one that consists essentially of one of the two possible enantiomers (i.e., is enantiomerically pure), and an optically pure compound having more than one chiral center is one that is both diastereomerically pure and enantiomerically pure. Preferably, the compounds of the present invention are used in a form that is at least 90% optically pure, that is, a form that contains at least 90% of a single isomer (80% enantiomeric excess ("e.e.") or diastereomeric excess ("d.e.")), more preferably at least 95% (90% e.e. or d.e.), even more preferably at least 97.5% (95% e.e. or d.e.), and most preferably at least 99% (98% e.e. or d.e.).

Additionally, the formulas are intended to cover solvated as well as unsolvated forms of the identified structures. For example, Formula I includes compounds of the indicated structure in both hydrated and non-hydrated forms. Other examples of solvates include the structures in combination with isopropanol, ethanol, methanol, DMSO, ethyl acetate, acetic acid, or ethanolamine.

In addition to compounds of the Formula I, II, III, and IV, the invention includes pharmaceutically acceptable prodrugs, pharmaceutically active metabolites, and pharmaceutically acceptable salts of such compounds.

"A pharmaceutically acceptable prodrug" is a compound that may be converted under physiological conditions or by solvolysis to the specified compound or to a pharmaceutically acceptable salt of such compound.

"A pharmaceutically active metabolite" is intended to mean a pharmacologically active product produced through metabolism in the body of a specified compound or salt thereof.

Metabolites of a compound may be identified using routine techniques known in the art and their activities determined using tests such as those described herein.

Prodrugs and active metabolites of a compound may be identified using routine techniques known in the art. See, e.g., Bertolini, G. et al., *J. Med. Chem.*, 40, 2011-2016 (1997); Shan, D. et al., *J. Pharm. Sci.*, 86 (7), 765-767; Bagshawe K., *Drug Dev. Res.*, 34, 220-230 (1995); Bodor, N., *Advances in Drug Res.*, 13, 224-331 (1984); Bundgaard, H., *Design of Prodrugs* (Elsevier Press 1985); and Larsen, I. K., *Design and Application of Prodrugs*, Drug Design and Development (Krogsgaard-Larsen et al., eds., Harwood Academic Publishers, 1991).

"A pharmaceutically acceptable salt" is intended to mean a salt that retains the biological effectiveness of the free acids and bases of the specified compound and that is not biologically or otherwise undesirable. A compound of the invention may possess a sufficiently acidic, a sufficiently basic, or both functional groups, and accordingly react with any of a number of inorganic or organic bases, and inorganic and organic acids, to form a pharmaceutically acceptable salt. Exemplary pharmaceutically acceptable salts include those salts prepared by reaction of the compounds of the present invention with a mineral or organic acid or an inorganic base, such as salts including sulfates, pyrosulfates, bisulfates, sulfites, bisulfites, phosphates, monohydrogenphosphates, dihydrogenphosphates, metaphosphates, pyrophosphates, chlorides, bromides, iodides, acetates, propionates, decanoates, caprylates, acrylates, formates, isobutyrates, caproates, heptanoates, propiolates, oxalates, malonates, succinates, suberates, sebacates, fumarates, maleates, butyne-1,4-dioates, hexyne-1,6-dioates, benzoates, chlorobenzoates, methylbenzoates, dinitrobenzoates, hydroxybenzoates, methoxybenzoates, phthalates, sulfonates, xylenesulfonates, phenylacetates, phenylpropionates, phenylbutyrates, citrates, lactates, γ-hydroxybutyrates, glycollates, tartrates, methane-sulfonates, propanesulfonates, naphthalene-1-sulfonates, naphthalene-2-sulfonates, and mandelates.

If the inventive compound is a base, the desired pharmaceutically acceptable salt may be prepared by any suitable method available in the art, for example, treatment of the free base with an inorganic acid, such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid and the like, or with an organic acid, such as acetic acid, maleic acid, succinic acid, mandelic acid, fumaric acid, malonic acid, pyruvic acid, oxalic acid, glycolic acid, salicylic acid, a pyranosidyl acid, such as glucuronic acid or galacturonic acid, an alpha-hydroxy acid, such as citric acid or tartaric acid, an amino acid, such as aspartic acid or glutamic acid, an aromatic acid, such as benzoic acid or cinnamic acid, a sulfonic acid, such as p-toluenesulfonic acid or ethanesulfonic acid, or the like.

If the inventive compound is an acid, the desired pharmaceutically acceptable salt may be prepared by any suitable method, for example, treatment of the free acid with an

inorganic or organic base, such as an amine (primary, secondary or tertiary), an alkali metal hydroxide or alkaline earth metal hydroxide, or the like. Illustrative examples of suitable salts include organic salts derived from amino acids, such as glycine and arginine, ammonia, primary, secondary, and tertiary amines, and cyclic amines, such as piperidine, morpholine and piperazine, and inorganic salts derived from sodium, calcium, potassium, magnesium, manganese, iron, copper, zinc, aluminum and lithium.

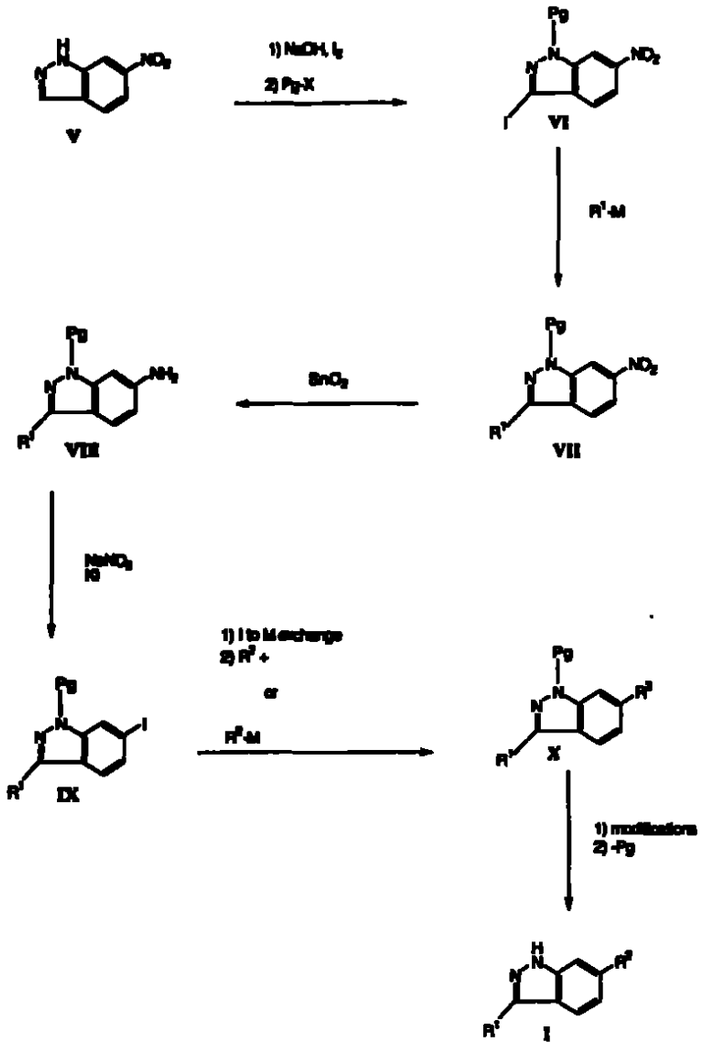
In the case of agents that are solids, it is understood by those skilled in the art that the inventive compounds and salts may exist in different crystal or polymorphic forms, all of which are intended to be within the scope of the present invention and specified formulas.

Therapeutically effective amounts of the agents of the invention may be used to treat diseases mediated by modulation or regulation of protein kinases. An "effective amount" is intended to mean that amount of an agent that, when administered to a mammal in need of such treatment, is sufficient to effect treatment for a disease mediated by the activity of one or more protein kinases, such as tyrosine kinases. Thus, e.g., a therapeutically effective amount of a compound of the Formula I, salt, active metabolite or prodrug thereof is a quantity sufficient to modulate, regulate, or inhibit the activity of one or more protein kinases such that a disease condition which is mediated by that activity is reduced or alleviated.

The amount of a given agent that will correspond to such an amount will vary depending upon factors such as the particular compound, disease condition and its severity, the identity (e.g., weight) of the mammal in need of treatment, but can nevertheless be routinely determined by one skilled in the art. "Treating" is intended to mean at least the mitigation of a disease condition in a mammal, such as a human, that is affected, at least in part, by the activity of one or more protein kinases, such as tyrosine kinases, and includes: preventing the disease condition from occurring in a mammal, particularly when the mammal is found to be predisposed to having the disease condition but has not yet been diagnosed as having it; modulating and/or inhibiting the disease condition; and/or alleviating the disease condition.

The inventive agents may be prepared using the reaction routes and synthesis schemes as described below, employing the techniques available in the art using starting materials that are readily available.

In one general synthetic process, compounds of Formula I are prepared according to the following reaction scheme:

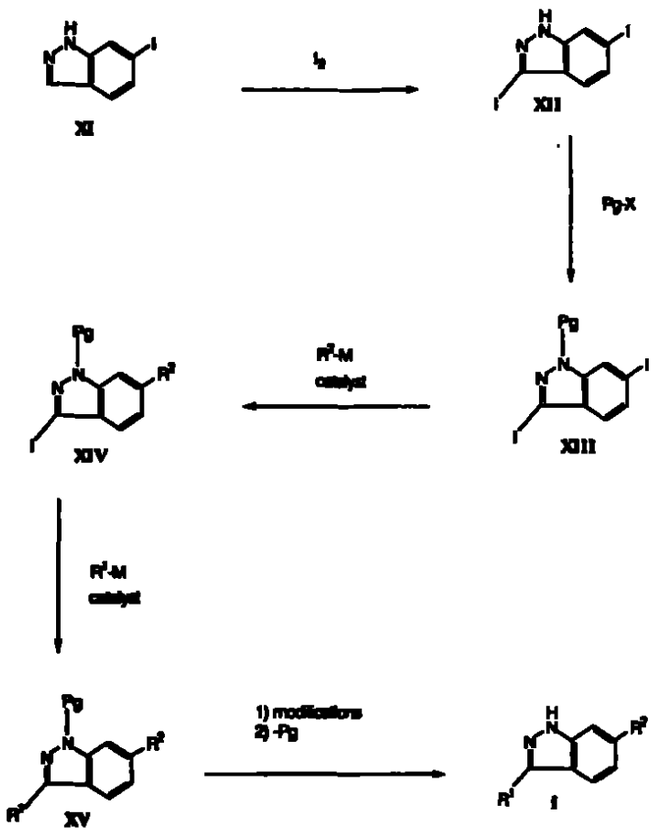


6-Nitroindazole (compound V) is treated with iodine and base, e.g., NaOH, in an aqueous/organic mixture, preferably with dioxane. The mixture is acidified and the product isolated by filtration. To the resulting 3-iodo-6-nitroindazole in dichloromethane-50% aqueous KOH at 0 °C is added a protecting group ("Pg") reagent (wherein X = halo), preferably trimethylsilylethoxymethyl chloride (SEM-Cl), and a phase transfer catalyst, e.g., tetrabutylammonium bromide (TBABr). After 1-4 hours, the two phases are diluted, the organics are separated, dried with sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude product is purified by silica gel chromatography to give compounds of formula VI. Treatment of compounds of formula VI in a suitable organic solvent with a suitable R^1-organometallic reagent, preferably an R^1-boronic acid, in the presence of aqueous base,

e.g., sodium carbonate, and a suitable catalyst, preferably $Pd(PPh_3)_4$ gives, after extractive work-up and silica gel chromatography, compounds of formula VII. The R^1 substituent may be exchanged within compounds of formula VII or later intermediates throughout this scheme by oxidative cleavage (e.g., ozonolysis) followed by additions to the resulting aldehyde functionality with Wittig or condensation transformations (typified in Example 42(a-e)). Treatment of compounds of formula VII with a reducing agent, preferably $SnCl_2$, provides, after conventional aqueous work up and purification, compounds of formula VIII. For the series of derivatives where Y = NH or N-lower alkyl, compounds of formula VIII may be treated with aryl or heteroaryl chlorides, bromides, iodides or triflates in the presence of a base, preferably Cs_2CO_3, and catalyst, preferably Pd-BINAP, (and where Y = N-lower alkyl, with a subsequent alkylation step) to provide compounds of formula X. To produce other Y linkages, sodium nitrite is added to compounds of formula VIII under chilled standard aqueous acidic conditions followed by the addition of potassium iodide and gentle warming. Standard work-up and purification produces iodide compounds of formula IX.

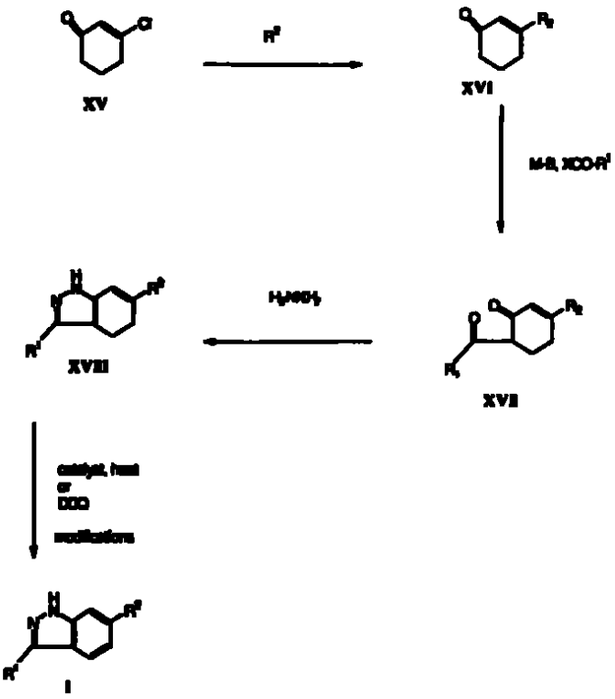
Treatment of compounds of formula IX with an organometallic reagent, e.g., butyllithium, promotes lithium halogen exchange. This intermediate is then reacted with an R^2 electrophile, e.g., a carbonyl or triflate, through the possible mediation of additional metals and catalysts, preferably zinc chloride and $Pd(PPh_3)_4$ to provide compounds of formula X. Alternatively, compounds of formula IX may be treated with an organometallic reagent such as an organoboronic acid in the presence of a catalyst, e.g., $Pd(PPh_3)_4$, under a carbon monoxide atmosphere to give compounds of formula X. Alternatively, for derivatives where Y = NH or S, compounds of formula IX may be treated with appropriate amines or thiols in the presence of base, preferably Cs_2CO_3 or K_3PO_4 and a catalyst, preferably Pd-BINAP or Pd-(bis-cyclohexyl)biphenylphosphine to provide compounds of formula X. Conventional functional group interchanges, such as oxidations, reductions, alkylations, acylations, condensations, and deprotections may then be employed to further derivatize this series giving final compounds of Formula I.

The inventive compounds of Formula I may also be prepared according general procedure shown in the following scheme:



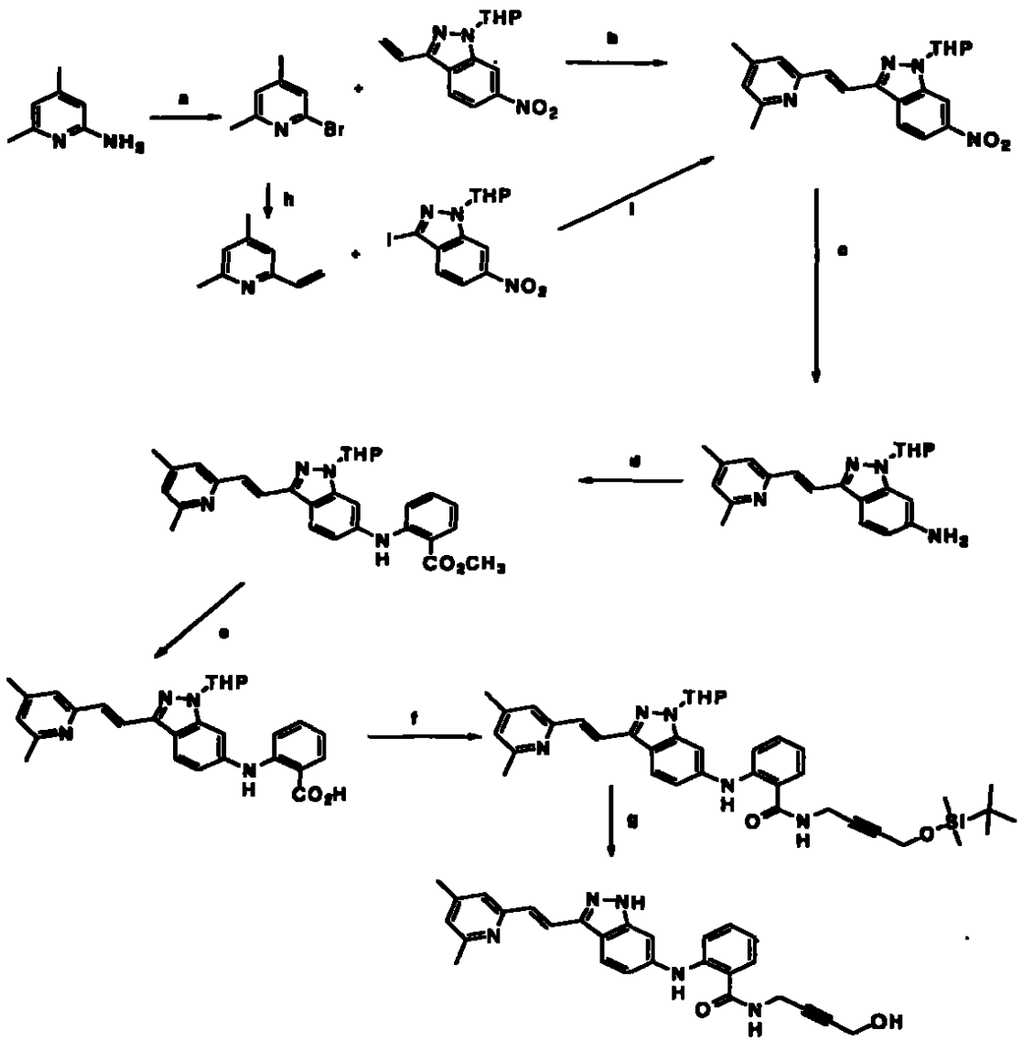
6-Iodoindazole (XI) is treated with iodine and base, e.g., NaOH, in an aqueous/organic mixture, preferably with dioxane. The mixture is acidified and the product XII is isolated by filtration. To the resulting 3,6 di-iodoindazole in dichloromethane-50% aqueous KOH at 0 °C is added a protecting group reagent, preferably SEM-Cl, and a phase transfer catalyst, e.g., TBABr. The two phases are diluted, the organics separated, dried with sodium sulfate, filtered and concentrated. The crude product is purified by silica gel chromatography to give compounds of the formula XIII. Treatment of compounds of formula XIII in a suitable organic solvent with a suitable R^2-organometallic reagent, e.g., R^2-ZnCl or boron R^2-boron reagent and a suitable catalyst, preferably $Pd(PPh_3)_4$ gives, after extractive work-up and silica gel chromatography, compounds of formula XIV. Treatment of compounds of formula XIV in a suitable organic solvent with a suitable R^1-organometallic reagent (e.g., boron R^1-boron reagent or R^1-ZnCl), in the presence of aqueous base, sodium carbonate, and a suitable catalyst, preferably $Pd(PPh_3)_4$ gives, after extractive work-up and silica gel chromatography, compounds of formula XV. Conventional functional group interchanges, such as oxidations, reductions, alkylations, acylations, condensations and deprotections may then be employed to further derivatize this series giving final compounds of Formula I.

Alternatively, compounds of Formula I where R^2 is a substituted or unsubstituted Y-Ar, where Y is O or S may be prepared according to the following general scheme:



A stirred acetone solution of 3-chloro-cyclohex-2-enone (XV), H-R^2, and anhydrous potassium carbonate is refluxed for 15-24 hours, cooled, and filtered. Concentrating and chromatographing the filtrate on silica gel gives 3-R^2-cyclohex-2-enone (XVI).

The ketones of formula XVI may be reacted with a suitable base (M-B), preferably lithium bis(trimethylsilyl)amide, and reacted with R^1-CO-X (where X = halogen), which after standard acid work up and purification provides compounds of the formula XVII. This product, in HOAc/EtOH, combined with hydrazine monohydrate, is heated at a suitable temperature for an appropriate time period, preferably at 60-80 °C for 2-4 hours. After cooling, the mixture is poured into saturated sodium bicarbonate solution, extracted with an organic solvent, concentrated, and purified on silica gel to give compounds of formula XVIII. Compounds of formula XVIII may be oxidized using a variety of known methods to give compounds of the Formula I.



An alternative process for synthesizing the compounds of the present invention follows:

Whereby the conditions of the steps a) through l) are as follows:

a) $NaNO_2$, Br_2, HBr, 0°C- -5°C; 48% yield;

b) $Pd(OAc)_2$, Pd(o-tolyl)$_3$, Di-isopropyl ethyl amine (DIEA), DMF, H_2O, degassed, microwave, 110°C, 1 hr; 68% yield;

c) Iron powder, saturated aqueous NH_4OH, EtOH, 45C; 72% yield;

d) Methyl-2-bromobenzoate, R-BINAP, $Pd_2(dba)_3$, Cs_2CO_3, toluene, degassed, 110°C overnight; 74% yield;

e) KOH, MeOH:THF:H_2O (3:1:1) 70°C, 2-3 hr; quantitative;

f) Protected amine, HATU, NEt_3, DMF, room temperature for 2 hours; 80% yield;

g) TsOH (12% TsOH in HOAc), EtOH (10% aqueous); 44% yield;

h) Tributylvinyltin, $Pd(PPh_3)_4$, 2,6-Di-t-butyl-4-methylphenol, toluene, degassed, 105°C; 31% yield;

i) $Pd(OAc)_2$, Pd(o-tolyl)$_3$, DIEA, DMF, degassed, 100°C; approximately 70% yield.

Other compounds of Formula I may be prepared in manners analogous to the general procedures described above or the detailed procedures described in the examples herein. The affinity of the compounds of the invention for a receptor may be enhanced by providing multiple copies of the ligand in close proximity, preferably using a scaffolding provided by a carrier moiety. It has been shown that provision of such multiple valence compounds with optimal spacing between the moieties dramatically improves binding to a receptor. See, e.g., Lee et al., *Biochem*, 23, 4255 (1984). The multivalency and spacing can be controlled by selection of a suitable carrier moiety or linker units. Such moieties include molecular supports which contain a multiplicity of functional groups that can be reacted with functional groups associated with the compounds of the invention. Of course, a variety of carriers can be used, including proteins such as BSA or HAS, a multiplicity of peptides including, for example, pentapeptides, decapeptides, pentadecapeptides, and the like. The peptides or proteins can contain the desired number of amino acid residues having free amino groups in their side chains; however, other functional groups, such as sulfhydryl groups or hydroxyl groups, can also be used to obtain stable linkages.

Compounds that potently regulate, modulate, or inhibit the protein kinase activity associated with receptors VEGF, FGF, CDK complexes, TEK, CHK1, LCK, FAK, and phosphorylase kinase among others, and which inhibit angiogenesis and/or cellular proliferation is desirable and is one preferred embodiment of the present invention. The present invention is further directed to methods of modulating or inhibiting protein kinase activity, for example in mammalian tissue, by administering an inventive agent. The activity of the inventive compounds as modulators of protein kinase activity, such as the activity of kinases, may be measured by any of the methods available to those skilled in the art, including *in vivo* and/or *in vitro* assays. Examples of suitable assays for activity measurements include those described in Parast C. et al., *BioChemistry*, 37, 16788-

16801 (1998); Jeffrey et al., *Nature*, 376, 313-320 (1995); WIPO International Publication No. WO 97/34876; and WIPO International Publication No. WO 96/14843. These properties may be assessed, for example, by using one or more of the biological testing procedures set out in the examples below.

The active agents of the invention may be formulated into pharmaceutical compositions as described below. Pharmaceutical compositions of this invention comprise an effective modulating, regulating, or inhibiting amount of a compound of Formula I, II, III, or IV and an inert, pharmaceutically acceptable carrier or diluent. In one embodiment of the pharmaceutical compositions, efficacious levels of the inventive agents are provided so as to provide therapeutic benefits involving modulation of protein kinases. By "efficacious levels" is meant levels in which the effects of protein kinases are, at a minimum, regulated. These compositions are prepared in unit-dosage form appropriate for the mode of administration, e.g., parenteral or oral administration.

An inventive agent is administered in conventional dosage form prepared by combining a therapeutically effective amount of an agent (e.g., a compound of Formula I) as an active ingredient with appropriate pharmaceutical carriers or diluents according to conventional procedures. These procedures may involve mixing, granulating and compressing or dissolving the ingredients as appropriate to the desired preparation.

The pharmaceutical carrier employed may be either a solid or liquid. Exemplary of solid carriers are lactose, sucrose, talc, gelatin, agar, pectin, acacia, magnesium stearate, stearic acid and the like. Exemplary of liquid carriers are syrup, peanut oil, olive oil, water and the like. Similarly, the carrier or diluent may include time-delay or time-release material known in the art, such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate alone or with a wax, ethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, methylmethacrylate and the like.

A variety of pharmaceutical forms can be employed. Thus, if a solid carrier is used, the preparation can be tableted, placed in a hard gelatin capsule in powder or pellet form or in the form of a troche or lozenge. *The amount of solid carrier* may vary, but generally will be from about 25 mg to about 1 g. If a liquid carrier is used, the preparation will be in the form of syrup, emulsion, drop, soft gelatin capsule, sterile injectable solution or suspension in an ampoule or vial or non-aqueous liquid suspension.

To obtain a stable water-soluble dose form, a pharmaceutically acceptable salt of an inventive agent is dissolved in an aqueous solution of an organic or inorganic acid, such as 0.3M solution of succinic acid or citric acid. If a soluble salt form is not available, the agent may be dissolved in a suitable cosolvent or combinations of cosolvents. Examples of suitable cosolvents include, but are not limited to, alcohol, propylene glycol, polyethylene glycol 300, polysorbate 80, gylcerin and the like in concentrations ranging from 0-60% of the total volume. In an exemplary embodiment, a compound of Formula I is dissolved in DMSO and diluted with

water. The composition may also be in the form of a solution of a salt form of the active ingredient in an appropriate aqueous vehicle such as water or isotonic saline or dextrose solution.

It will be appreciated that the actual dosages of the agents used in the compositions of this invention will vary according to the particular complex being used, the particular composition formulated, the mode of administration and the particular site, host and disease being treated. Optimal dosages for a given set of conditions can be ascertained by those skilled in the art using conventional dosage-determination tests in view of the experimental data for an agent. For oral administration, an exemplary daily dose generally employed is from about 0.001 to about 1000 mg/kg of body weight, more preferably from about 0.001 to about 50 mg/kg body weight, with courses of treatment repeated at appropriate intervals. Administration of prodrugs are typically dosed at weight levels which are chemically equivalent to the weight levels of the fully active form.

The compositions of the invention may be manufactured in manners generally known for preparing pharmaceutical compositions, e.g., using conventional techniques such as mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing. Pharmaceutical compositions may be formulated in a conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers, which may be selected from excipients and auxiliaries that facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically.

Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen. For injection, the agents of the invention may be formulated into aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks's 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 readily by combining the active compounds with pharmaceutically acceptable carriers known in the art. Such carriers enable the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for oral ingestion by a patient to be treated. Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained using a solid excipient in admixture with the active ingredient (agent), optionally grinding the resulting mixture, and processing the mixture of granules after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients include: fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; and cellulose preparations, for example, maize starch, wheat starch, rice starch, potato starch, gelatin, gum, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium carboxymethylcellulose, or polyvinylpyrrolidone (PVP).

If desired, disintegrating agents may be added, such as crosslinked polyvinyl pyrrolidone, agar, or alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate.

Dragee cores are provided with suitable coatings. For this purpose, concentrated sugar solutions may be used, which may optionally contain gum arabic, 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 agents.

Pharmaceutical preparations 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 fillers such as lactose, binders such as starches, and/or lubricants such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active agents may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid paraffin, or liquid polyethylene glycols. In addition, stabilizers may be added. All formulations for oral administration should be in dosages suitable for such administration. For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner.

For administration intranasally or by inhalation, the compounds for use according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebuliser, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of gelatin for use in an inhaler or insufflator and the like may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus 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 formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents.

Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Additionally, suspensions of the active agents may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Aqueous injection suspensions may 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 or agents

which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

For administration to the eye, a compound of the Formula I, II, III, or IV is delivered in a pharmaceutically acceptable ophthalmic vehicle such that the compound is maintained in contact with the ocular surface for a sufficient time period to allow the compound to penetrate the cornea and/or sclera and internal regions of the eye, including, for example, the anterior chamber, posterior chamber, vitreous body, aqueous humor, vitreous humor, cornea, iris/ciliary, lens, choroid/retina and sclera. The pharmaceutically acceptable ophthalmic vehicle may be an ointment, vegetable oil, or an encapsulating material. A compound of the invention may also be injected directly into the vitreous humor or aqueous humor.

Further, a compound may be also be administered by well known, acceptable methods, such as subtebnon and/or subconjunctival injections. As is well known in the ophthalmic art, the macula is comprised primarily of retinal cones and is the region of maximum visual acuity in the retina. A Tenon's capsule or Tenon's membrane is disposed on the sclera. A conjunctiva 38 covers a short area of the globe of the eye posterior to the limbus (the bulbar conjunctiva) and folds up (the upper cul-de-sac) or down (the lower cul-de-sac) to cover the inner areas of the upper eyelid and lower eyelid, respectively. The conjunctiva is disposed on top of Tenon's capsule.

The sclera and Tenon's capsule define the exterior surface of the globe of the eye. For treatment of ARMD, CNV, retinopathies, retinitis, uveitis, cystoid macular edema (CME), glaucoma, and other diseases or conditions of the posterior segment of the eye, it is preferable to dispose a depot of a specific quantity of an ophthalmically acceptable pharmaceutically active agent directly on the outer surface of the sclera and below Tenon's capsule. In addition, in cases of ARMD and CME it is most preferable to dispose the depot directly on the outer surface of the sclera, below Tenon's capsule, and generally above the macula. In a study using New Zealand White rabbits, a drug depot of 4,9(11)-Pregnadien-17.alpha.,21-diol-3,20-dione-21-acetate, an angiostatic steroid available from Steraloids, Inc. of Wilton, New Hampshire, was disposed directly on the outer surface of the sclera, below the Tenon's capsule, and slightly posterior of the equator of the rabbit eyes. Such a drug depot resulted in a concentration of the angiostatic steroid, averaged over the entire retina and measured the day after the injection, about ten times greater than a similar concentration delivered by a depot located below the conjunctiva but above the Tenon's capsule of the rabbit eyes. Given the fact that the Tenon's capsule of a New Zealand White rabbit is very thin, these beneficial results are highly unexpected. It is important to note that Tenon's capsule of the human eye is also very thin. 4,9(11)Pregnadien-17.alpha.,21-diol-3,20-dione-21-acetate, and the related compound 4,9(11)-Pregnadien-17.alpha.,21-diol-3,20-dione, are more fully

described in U.S. Pat. Nos. 5,770,592 and 5,679,666, which are incorporated herein in their entirety by reference.

Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a 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, e.g, containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described above, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long-acting formulations may be administered by implantation (for example, subcutaneously or intramuscularly) intramuscular injection or by the above mentioned subtenon or intravitreal injection.

Within particularly preferred embodiments of the invention, the compounds may be prepared for topical administration in saline (combined with any of the preservatives and antimicrobial agents commonly used in ocular preparations), and administered in eyedrop form. The anti-angiogenic factor solution or suspension may be prepared in its pure form and administered several times daily. Alternatively, anti-angiogenic compositions, prepared as described above, may also be administered directly to the cornea.

Within preferred embodiments, the composition is prepared with a muco-adhesive polymer which binds to cornea. Thus, for example, the compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example, as an emulsion in an acceptable oil) or ion-exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt. Within further embodiments, the anti-angiogenic factors or anti-angiogenic compositions may be utilized as an adjunct to conventional steroid therapy.

A pharmaceutical carrier for hydrophobic compounds is a cosolvent system comprising benzyl alcohol, a nonpolar surfactant, a water-miscible organic polymer, and an aqueous phase. The cosolvent system may be a 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:5W) contains 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 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 be substituted for dextrose.

Alternatively, other delivery systems for hydrophobic pharmaceutical compounds may be employed. Liposomes and emulsions are known examples of delivery vehicles or carriers for hydrophobic drugs. Certain organic solvents such as dimethylsulfoxide also may be employed, although usually 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 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 also may comprise suitable solid- or gel-phase carriers or excipients. Examples of such carriers or excipients include calcium carbonate, calcium phosphate, sugars, starches, cellulose derivatives, gelatin, and polymers such as polyethylene glycols.

Some of the compounds of the invention may be provided as salts with pharmaceutically compatible counter ions. Pharmaceutically compatible salts may be formed with many acids, including hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free-base forms.

The preparation of preferred compounds of the present invention is described in detail in the following examples, but the artisan will recognize that the chemical reactions described may be readily adapted to prepare a number of other protein kinase inhibitors of the invention. For example, the synthesis of non-exemplified compounds according to the invention may be successfully performed by modifications apparent to those skilled in the art, e.g., by appropriately protecting interfering groups, by changing to other suitable reagents known in the art, or by making routine modifications of reaction conditions. Alternatively, other reactions disclosed herein or known in the art will be recognized as having applicability for preparing other compounds of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION AND PREFERRED EMBODIMENTS

EXAMPLES

In the examples described below, unless otherwise indicated all temperatures are set forth in degrees Celsius and all parts and percentages are by weight. Reagents were purchased from commercial suppliers such as Aldrich Chemical Company or Lancaster Synthesis Ltd. and were used without further purification unless otherwise indicated. Tetrahydrofuran (THF), N,N-dimethylformamide (DMF), dichloromethane, toluene, and dioxane were purchased from Aldrich in Sure seal bottles and used as received. All solvents

were purified using standard methods readily known to those skilled in the art, unless otherwise indicated.

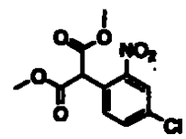
The reactions set forth below were done generally under a positive pressure of argon or nitrogen or with a drying tube, at ambient temperature (unless otherwise stated), in anhydrous solvents, and the reaction flasks were fitted with rubber septa for the introduction of substrates and reagents via syringe. Glassware was oven dried and/or heat dried. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on glass-backed silica gel 60 F 254 plates Analtech (0.25 mm) and eluted with the appropriate solvent ratios (v/v), and are denoted where appropriate. The reactions were assayed by TLC and terminated as judged by the consumption of starting material.

Visualization of the TLC plates was done with a *p*-anisaldehyde spray reagent or phosphomolybdic acid reagent (Aldrich Chemical 20 wt % in ethanol) and activated with heat. Work-ups were typically done by doubling the reaction volume with the reaction solvent or extraction solvent and then washing with the indicated aqueous solutions using 25% by volume of the extraction volume unless otherwise indicated. Product solutions were dried over anhydrous Na_2SO_4 prior to filtration and evaporation of the solvents under reduced pressure on a rotary evaporator and noted as solvents removed *in vacuo*. Flash column chromatography (Still et al., *J. Org. Chem.*, 43, 2923 (1978)) was done using Baker grade flash silica gel (47-61 μm) and a silica gel: crude material ratio of about 20:1 to 50:1 unless otherwise stated. Hydrogenolysis was done at the pressure indicated in the examples or at ambient pressure.

^{1}H-NMR spectra were recorded on a Bruker instrument operating at 300 MHz and ^{13}C-NMR spectra were recorded operating at 75 MHz. NMR spectra were obtained as $CDCl_3$ solutions (reported in ppm), using chloroform as the reference standard (7.25 ppm and 77.00 ppm) or CD_3OD (3.4 and 4.8 ppm and 49.3 ppm), or internally tetramethylsilane (0.00 ppm) when appropriate. Other NMR solvents were used as needed. When peak multiplicities are reported, the following abbreviations are used: s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), br (broadened), dd (doublet of doublets), dt (doublet of triplets). Coupling constants, when given, are reported in Hertz (Hz).

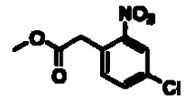
Infrared (IR) spectra were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrometer as neat oils, as KBr pellets, or as $CDCl_3$ solutions, and when given are reported in wave numbers (cm^{-1}). The mass spectra were obtained using LSIMS or electrospray. All melting points (mp) are uncorrected.

Example 1(a) 2-(4-Chloro-2-nitro-phenyl)-malonic acid dimethyl ester



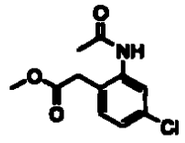
To a stirred slurry of NaH (36.0 g, 1500 mmol) in NMP (1.0 L) was added dimethyl malonate (137.4 mL, 1200 mmol) drop wise. The reaction was cooled as needed to keep the internal temperature below 30 degrees Celsius. After gas evolution ceased, 2,4-dichloronitrobenzene (192 g, 1000 mmol) was added to the reaction. It was carefully heated to 65 degrees Celsius until the reaction was complete as determined by HPLC. The reaction was cooled to room temperature, and then poured over 500 mL ice mixed with 150 mL conc. HCl. The pH of the aqueous layer was adjusted to neutral using 1 N NaOH. The solids were removed by filtering through a coarse fritted filter, and rinsed with water (3 L). The yellow solids were allowed to dry overnight. Yield 261.5 g, 91%.

Example 1(b) (4-Chloro-2-nitro-phenyl)-acetic acid methyl ester



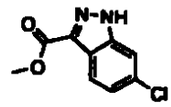
A solution of 2-(4-Chloro-2-nitro-phenyl)-malonic acid dimethyl ester (195 g, 679.4 mmol) in water (100 mL) and NMP (1000 mL) was heated to reflux for 3.5 hours. The solvent was removed by rotary evaporation to an oil. The oil was dissolved in EtOAc, and then washed with water (5 x 300 mL). The aqueous layer was then extracted with EtOAc (4 x 300 mL). The organic was washed with water. The organic layers were combined and dried over $MgSO_4$. After removing the solids by filtration, the solvent was evaporated to yield the desired product as a orange/brown solid (160.0 g, 95%).

Example 1(c) (2-Acetylamino-4-chloro-phenyl)-acetic acid methyl ester



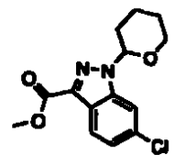
An argon filled flask was charged with (4-Chloro-2-nitro-phenyl)-acetic acid methyl ester (40 g, 175 mmol), 10% Pd/C (2.5 g), acetic anhydride (64 mL, 677 mmol), water (9 mL) and acetic acid (150 mL). The flask was vacuum flushed with hydrogen gas at 30 PSI and shook vigorously. After 2 hours, more 10% Pd/C (2 g) was added, and the reaction was complete after a total of 4 hours reaction time. The 10 % Pd/C was removed by filtration, and the solvent was removed by rotary evaporation.

Example 1(d) 6-Chloro-1H-indazole-3-carboxylic acid methyl ester



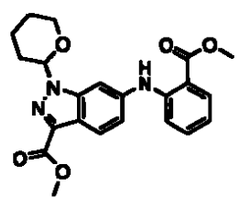
To a solution of (2-Acetylamino-4-chloro-phenyl)-acetic acid methyl ester (32.0 g, 133 mmol) in acetic acid (200 mL) stirred at 90 degree Celsius was added *tert*-butyl nitrite (20.5 mL, 172.3 mmol) over 1 hour. The reaction was poured into water (1.4 L) and the solids were recovered by filtration. The yellow precipitate was dissolved in EtOAc, then washed with saturated NaCl. The organic was dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated to a solid. The solids were triturated with hexanes and filtered to afford the desired material (21.63 g, 77%).

Example 1(e) 6-Chloro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylic acid methyl ester



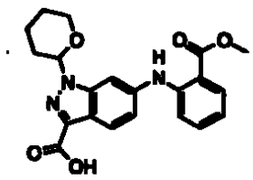
To a slurry of 6-Chloro-1H-indazole-3-carboxylic acid methyl ester (8.3 g, 39.5 mmol) in MeCN (200 mL) was added 3,4-Dihydro-2H-pyran (5.4 mL, 59.3 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (237 mg, 1.25 mmol). After letting the reaction stir for 10 minutes, saturated $NaHCO_3$ (1 mL) was added and the solvent was removed by rotary evaporation to a volume of 100 mL. The mixture was diluted with EtOAc and washed with water (50 mL) and then with saturated NaCl (50 mL). The organic layer was then dried over Na_2SO_4. After the solids were removed by filtration, the organic layer was concentrated to an oil by rotary evaporation. The product was precipitated from the oil using hexanes to yield the desired product (7.667 g, 66% yield).

Example 1(f) 6-(2-Methoxycarbonyl-phenylamino)-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylic acid methyl ester



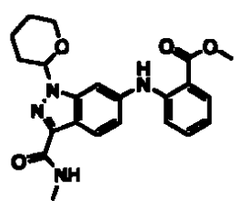
To a solution of 6-Chloro-1H-Indazole-3-carboxylic acid methyl ester (2.94g, 10.0 mmol) in 1,2-dimethoxyethane (30 mL) was added K_3PO_4 (5.32g, 25.0 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (459 mg, 0.05 mmol), 2-(dicyclohexylphosphino) biphenyl (701 mg, 2.0 mmol), and methyl anthranilate (2.59 mL, 20.0 mmol). The solution was vacuum flushed with argon three times before being heated to 80 degrees Celsius for 18 hours. The reaction was cooled to room temperature and the solids were removed by filtration. After washing the solids with ethyl acetate, the solvent was removed by rotary evaporation. The residual oil was chromatographed (150 g silica gel, 10 – 30% EtOAc/Hex) to yield 1.23 g (51%) of the desired product.

Example 1(g)6-(2-Methoxycarbonyl-phenylamino)-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylic acid



To a solution of 6-(2-Methoxycarbonyl-phenylamino)-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylic acid methyl ester (2.05 g, 5 mmol) in methanol (18 mL) and tetrahydrofuran (8 mL), was added a solution of sodium hydroxide (0.30g, 7.5 mmol) in water (2.7 mL). The reaction was stirred at room temperature for 3 hours and was then neutralized with 1 N HCl to a pH of 1. The mixture was diluted with EtOAc (25 mL) and water (25 mL). After separating the layers, the aqueous layer was washed with CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). The combined organic extracts were washed with saturated NaCl (100 mL) and then dried over Na_2SO_4. The solids were filtered and the liquid was concentrated to an oil. The product was crystallized from EtOAc and Hexanes to yield the desired product (1.616 g, 82%).

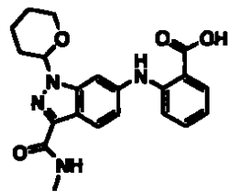
Example 1(h) 2-[3-Methylcarbamoyl-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester



To a solution of 6-(2-Methoxycarbonyl-phenylamino)-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylic acid (0.50g, 1.27 mmol) in DMF was added triethylamine (0.42 mL,

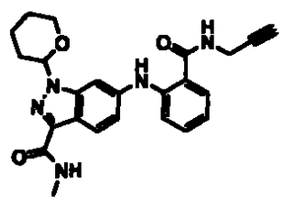
3.04 mmol), methylamine (1.9 mL, 3.81 mmol), and HATU (0.578 g, 1.52 mmol). The reaction was stirred for 3 hours and then concentrated by rotary evaporation. The crude oil was chromatographed (50 g silica gel, 25 – 50% EtOAc/hexanes) to yield the desired product (214 mg, 42 %).

Example 1(i) 2-[3-Methylcarbamoyl-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid



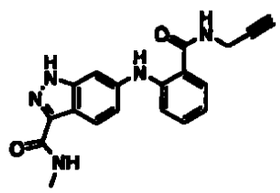
To a solution of 2-[3-Methylcarbamoyl-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester (0.20g, 0.49 mmol) in methanol (1.4 mL) and tetrahydrofuran (0.6 mL) was added a solution of sodium hydroxide (59 mg, 1.47 mmol) in water (0.3 mL). The reaction was heated to 60 degrees Celsius for 1 hour and then was cooled to room temperature. The pH was adjusted with 2 N HCl to a pH of 2. EtOAc (30 mL) and water (30 mL) was added and the layers were separated. The aqueous was extracted with EtOAc (3 x 20 mL) and the organic layers were combined. After washing with water (15 mL), the organic layer was dried over Na_2SO_4. The solids were filtered away, and the organic was evaporated to yield a yellow solid (193 mg, 100%).

Example 1(j) 6-(2-Prop-2-ynylcarbamoyl-phenylamino)-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylic acid methylamide



To a solution of 2-[3-Methylcarbamoyl-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (150 mg, 0.381 mmol) in DMF (3.6 mL) was added propargylamine (0.052 mL, 0.761 mmol), TEA (0.264 mL, 1.90 mmol), and HATU (217 mg, 0.571 mmol). The reaction was stirred for 4 hours, and then diluted with EtOAc (30 mL) and water (30 mL). The layers were separated, and the aqueous was extracted with EtOAc (2 x 20 mL). The combined organics were washed with saturated NaCl (15 mL) and then dried over Na_2SO_4. The solids were removed by filtration, and the liquid was concentrated by rotary evaporation to a yellow oil (164 mg, 100%).

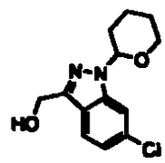
Example 1(k) 6-(2-Prop-2-ynylcarbamoyl-phenylamino)-1H-indazole-3-carboxylic acid methylamide



Dissolved 6-(2-Prop-2-ynylcarbamoyl-phenylamino)-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylic acid methylamide (30 mg) in 1.5 mL of a 90:10:1 mixture of CH_2Cl_2:TFA:triethyl silane and heat to reflux for 2 hours. Diluted the solution with toluene (40 mL) and concentrate by rotary evaporation to an oil. Dissolved the oil in DMF (1 mL), and filter using a 0.2-micron syringe filter. Used prep-HPLC to isolate the desired compound (12 mg, 50%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$-d) δ 9.96 (1H, s), □□□(□s),??? 8.28 (1H, d, J = 8.85 Hz), 7.47 (1H, m), 7.34 (1H, m), 7.22 (1H, m), 7.15 (1H, dd, J1 = 8.76 Hz, J2 = 1.79 Hz), 6.99 (1H, m), 6.86 (1H, t, J = 6.97Hz), 6.31 (1H, m), 4.23 (2H, dd, J1 = 5.18 Hz, J2 = 2.54 Hz), 3.49 (3H, s), 2.29 (s, 1H).

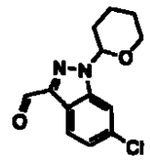
Anal. Calcd. For $C_{19}H_{17}N_5O_2$•1.0 MeOH•0.1 TFA: C, 62.08; H, 5.44; N, 17.92. Found: C, 61.78; H, 5.45; N, 18.04.

Example 2(a) [6-Chloro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-3-yl]-methanol



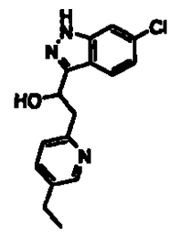
To a solution of 6-Chloro-1H-indazole-3-carboxylic acid methyl ester (2.94 g, 10.0 mmol) in dry CH_2Cl_2 (50 mL) cooled to –78 degrees Celsius was added DIBAL-H (3.56 mL, 20.0 mmol) slowly. After the addition was complete, the reaction was allowed to warm to room temperature, where HPLC showed that there was a remaining 10% starting material. Extra DIBAL-H (0.35 mL) was then added and stirred for 10 minutes. The reaction was diluted with EtOAc (1000 mL) and washed with 1 N HCl (2 x 100 mL). It was further washed with 1 N $NaHCO_3$ (100 mL), and then with saturated NaCl (100 mL). The organic was dried over Mg SO_4, filtered, and then concentrated to a white solid (2.65 g, 99.5 %).

Example 2(b) 6-Chloro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carbaldehyde



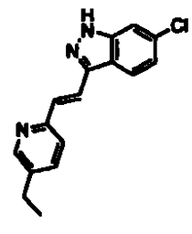
A solution of [6-Chloro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-3-yl]-methanol (1.75 g, 6.58 mmol), IBX (2.76 g, 9.87 mmol) and DMSO (27 mL) was stirred overnight. The reaction was diluted in EtOAc and water. The layers were separated, and the aqueous was extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The organics were combined and washed with saturated NaCl (100 mL). The organic was dried over $MgSO_4$, filtered, and then concentrated to a solid. The solid was dissolved in CH_2Cl_2, and filtered. The organic was evaporated to yield the desired product (1.707g, 92%).

Example 2(c) 1-(6-Chloro-1H-indazol-3-yl)-2-(5-ethyl-pyridin-2-yl)-ethanol



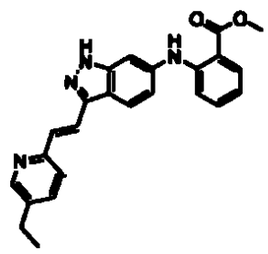
To a stirred solution of 4-ethyl-2-methylpyridine (0.458 g, 3.79 mmol) in THF (4mL) at –50 degrees Celsius, add butyl lithium (1.5 mL, 2.5 M, 3.79 mmol) slowly and stir for 10 minutes. To the reaction, slowly add a solution of 6-Chloro-1H-indazole-3-carbaldehyde (0.5 g, 1.89 mmol) in THF (4 mL). After stirring for 10 minutes, the reaction was quenched with 1 N citric acid (10 mL). The mixture was diluted with EtOAc (50 mL), water (20 mL), and saturated NaCl (10 mL). The layers were separated, and the aqueous was extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The organics were combined and washed with saturated NaCl (20 mL). After drying the organic layer over Na_2SO_4, the solids were removed by filtration and the liquid was concentrated to an oil by rotary evaporation. Chromatography (40 g silica gel, 60 – 100% EtOAc/hex) yields the desired product (142 mg, 32%) and recovered 6-Chloro-1H-indazole-3-carbaldehyde (348 mg).

Example 2(d) 6-Chloro-3-[2-(5-ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazole



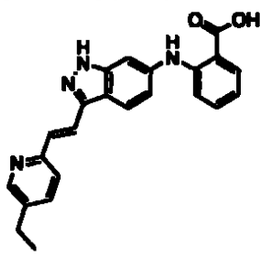
To a stirred solution of 1-(6-Chloro-1H-indazol-3-yl)-2-(5-ethyl-pyridin-2-yl)-ethanol (232 mg, 0.60 mmol) in CH_2Cl_2 was added TEA (0.25 mL, 1.81 mmol) and mesyl chloride (0.070 mL, 0.90 mmol). The reaction was stirred for 30 minutes, and then DBU (2 mL) was added. The reaction was refluxed for 18 hours and then quenched with 40 mL of 1 N citric acid. The layers were separated, and the aqueous was extracted with 20 mL CH_2Cl_2. The combined organics were dried over Na_2SO_4, filtered, and concentrated by rotary evaporation. Purification by chromatography (12 g silica gel, 50 – 70% EtOAc/hexanes) yielded the desired compound (135 mg, 71 %).

Example 2(e) 2-[3-[2-(5-Ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino)-benzoic acid methyl ester



1,2-Dimethoxymethane (2 mL) was added to 6-Chloro-3-[2-(5-ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazole (130 mg, 0.354 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (16 mg, 0.018 mmol), -(dicyclohexylphosphino)biphenyl (25 mg, 0.071 mmol), K_3PO_4 (0.188 g, 0.885 mmol), and methyl anthranilate (0.092 mL, 0.71 mmol). The reaction was vacuum flushed with argon (4x) and then heated to 80 degrees Celsius for 19 hours. The reaction was diluted with EtOAc (20 mL) and filtered through a silica gel plug. After washing with EtOAc (50 mL), the solvent was removed by rotary evaporation. The crude oil was purified by chromatography (40 g silica gel, 30 – 40% EtOAc/hexanes) to yield the desired product (54 mg, 32%).

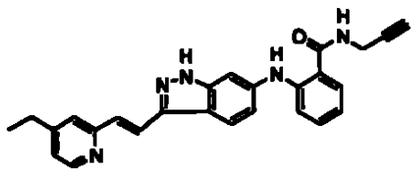
Example 2(f) 2-[3-[2-(5-Ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino)-benzoic acid



To a solution of 2-[3-[2-(5-Ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino)-benzoic acid methyl ester (50 mg, 0.104 mmol) in methanol (0.42 mL) and THF (0.10 mL) was added a solution of sodium hydroxide (12 mg, 0.311 mmol) in water (0.05 mL). The solution was heated to 60 degrees Celsius for 3.5 hours and then neutralized with

saturated NH_4Cl. The reaction was diluted with water (20 mL), and then extracted with EtOAc (2 x 20 mL). The combined extracts were first dried over Na_2SO_4, and then the solids were removed by filtration. The desired product (48.7 mg, 100%) was recovered after rotary evaporation to remove the solvents.

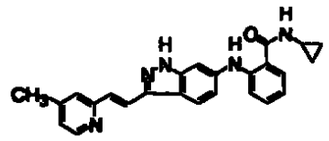
Example 2(g) 2-[3-[2-(5-Ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-N-prop-2-ynyl-benzamide



To 2-{3-[2-(5-Ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-benzoic acid (49 mg, 0.105 mmol) was added 2 mL of a 90:10:1 mixture of CH_2Cl_2:TFA:TES. The reaction was stirred at reflux for 1 hour, and then diluted with toluene (20 mL). The solvent was removed by rotary evaporation to yield a thick oil. The oil was dissolved in DMF (1 mL) and to this solution was added TEA (0.072 mL, 0.52 mmol), propargyl amine (0.014 mL, 0.208 mmol), and HATU (59 mg, 0.156 mmol). The reaction was stirred for 3 hours, and then purified by preparatory HPLC to yield the desired product (29 mg, 66%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$-d): δ 9.83 (1H, s), 8.63 (2H, s), 8.04 (2H, m), 7.68 (2H, s), 7.47 (1H, m), 7.32 (1H, d, J = 1.51 Hz), 7.10 (1H, dd, J1 = 8.67 Hz, J2 = 1.88 Hz), 6.93 (1H, m), 6.07 (2H, dd, J1 = 5.09 Hz, J2 = 2.26 Hz), 3.15 (1H, t, J = 2.35 Hz), 2.97 (2H, s), 2.74 (1H, s), 2.29 (1H, s), 1.27 (3H, t, J = 7.44 Hz)

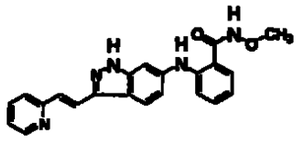
Anal. Calcd. for $C_{25}H_{22}N_5O$•0.3 H_2O•1.2 TFA: C, 60.51; H, 4.43; N, 12.42. Found: C, 60.38; H, 4.73; N, 12.44.

Example 2(h) N-Cyclopropyl-2-{3-[(E)-2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-benzamide



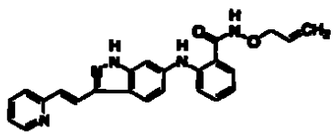
The title compound was prepared analogously to 2-{3-[2-(5-Ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-N-prop-2-ynyl-benzamide described above, substituting 2,4-dimethyl-pyridine for 4-ethyl-2-methyl-pyridine in the step where 1-(6-Chloro-1H-indazol-3-yl)-2-(5-ethyl-pyridin-2-yl)-ethanol was prepared, and substituting cyclopropyl amine in place of propargyl amine in the final step of the sequence. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.85 (1H, s), 8.56 (2H, m), 8.20 (3H, m), 7.53 (5H, m), 7.35 (1H, s), 7.2 (1H, d, J = 6.5 Hz), 7.0 (1H, s), 2.83 (1H, m), 0.70 (2H, m), 0.56 (2H, m). ESIMS ($M+H^+$): 410.3.

Example 3(a) N-Methoxy-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



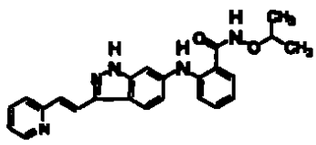
A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), O-methyl-hydroxylamine hydrochloride (15 mg, 0.17 mmol), triethylamine(58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 21.6 mg (67%) of the title compound as a yellow solid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.23 (1H, s), 8.71 (1H, d, J=2.2), 8.05 (4H, m), 7.51 (5H, m), 7.25 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 7.7 Hz), 6.91 (1H, m), 5.98 (1H, m), 4.31 (1H, d, J= 14.3), 7.20 (1H, d, J=7.3),4.42 (2H, d, J=3.2). ESIMS ($M+H^+$): 412.1.

Example 3(b) N-Allyloxy-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



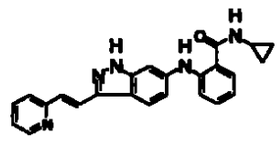
A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), O-allyl-hydroxylamine hydrochloride (18.3 mg, 0.17 mmol), triethylamine(58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 25.5 mg (74%) of the title compound as a yellow solid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.26 (1H, s), 8.67 (2H, d, J=3.4), 8.05 (4H, m), 7.48 (5H, m), 7.23 (1H, s), 7.04 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.91 (1H, m), 3.69 (3H, s). ESIMS ($M+H^+$): 386.1.

Example 3(c) N-Isopropoxy-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



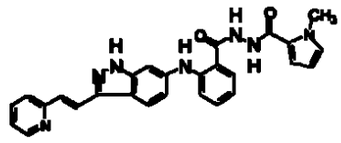
A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), O-isopropyl-hydroxylamine hydrochloride (18.7 mg, 0.17 mmol), triethylamine(58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 17.4 mg (50%) of the title compound as a yellow solid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.23 (1H, s), 8.69 (H, d, J=2.1), 8.03 (4H, m), 7.50 (5H, m), 7.23 (1H, s), 7.04 (1H, d, J = 6.7 Hz), 6.92 (1H, m), 5.98 (1H, m), 4.13 (1H, m), 1.29 (6H, d, J=8.1). ESIMS (M+H$^+$): 414.1.

Example 3(d) N-Cyclopropyl-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



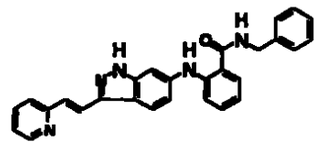
A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), cyclopropyl amine (11.6 µL, 0.17 mmol), triethylamine (58 µl, 0.25 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 11.7 mg (35%) of the title compound as a yellow solid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.81 (1H, s), 8.68 (1H, d, J=1.7), 8.51 (1H, s), 8.01 (4H, m), 7.50 (5H, m), 7.24 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=5.3), 6.89 (1H, t, J=4.2), 2.84 (1H, m), 0.72 (2H, m), 0.56 (2H, m). ESIMS (M+H$^+$): 396.1.

Example 3(f) 1-Methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid N'-(1-{2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-phenyl}-methanoyl)-hydrazide



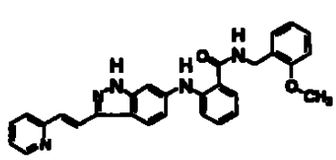
A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), 1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid hydrazide (23.3 mg, 0.17 mmol), triethylamine(58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 16.1 mg (40%) of the title compound as a yellow solid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 10.39 (1H, s), 10.00 (1H, s), 9.52 (1H, s), 8.67 (1H, d, J=2.4), 8.07 (4H, m), 7.77 (1H, d, J=5.2), 7.51 (4H, m), 7.32 (1H, s), 7.09 (1H, d, J=6.3), 6.98 (3H, m), 6.13 (1H, m), 3.87 (3H, s). ESIMS (M+H$^+$): 478.1.

Example 3(g)N-Benzyl-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



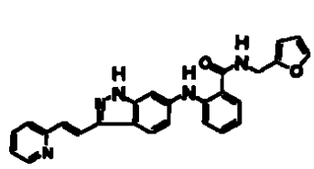
A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), benzylamine (18.2 µL, 0.17 mmol), triethylamine (58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 45.2 mg (76%) of the title compound as a TFA salt (1.5 H_2O, 2.1 TFA, effective MW=711.96). ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 9.86 (1H, s), 9.14 (1H, t, J=5.4), 8.73 (1H, d, J=4.8), 8.29 (4H, m), 7.56 (1H, d, J=7.0), 7.74 (2H, m), 7.89 (2H, m), 7.31 (5H, m), 7.16 (1H, d, J=7.8), 6.93 (1H, t, J=7.3), 4.46 (2H, d, J=6.1). ESIMS ($M+H^+$): 446.5.

Example 3(h)N-(2-Methoxy-benzyl)-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



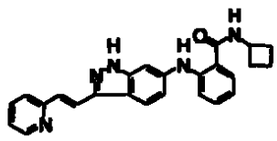
A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), *o*-methoxybenzylamine (21.8 µL, 0.17 mmol), triethylamine (58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 46 mg (81%) of the title compound as a TFA salt (1.5 H_2O, 1.5 TFA, effective MW=673.59). ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 9.83 (1H, s), 9.03 (1H, t, J=3.4), 8.70 (1H, d, J=3.7), 8.08 (4H, m), 7.82 (1H, d, J=7.4), 7.49 (4H, m), 7.21 (3H, m), 6.96 (4H, m), 4.48 (2H, d, J=6.3). ESIMS ($M+H^+$): 476.1.

Example 3(i) N-Furan-2-ylmethyl-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



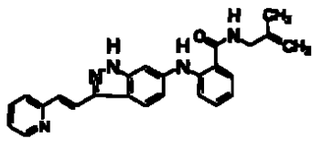
A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), C-furan-2-yl-methylamine (19 µL, 0.17 mmol), triethylamine (58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 45 mg (85%) of the title compound as a TFA salt (1.5 H_2O, 1.5 TFA, effective MW=633.52). ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.82(1H, s), 9.05 (1H, t, J=2.6), 8.73 (1H, d, J=3.7), 8.13 (4H, m), 7.73 (1H, d, J=6.8), 7.57 (2H, m), 7.26 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=7.5), 6.40 (1H, m), 6.28 (1H, m), 4.48 (2H, d, J=6.5). ESIMS ($M+H^+$): 436.1.

Example 3(j) N-Cyclobutyl-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), cyclobutylamine (18.2 µL, 0.17 mmol), triethylamine (58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 43.2 mg (92%) of the title compound as a TFA salt (1.5 H2O, 1.1 TFA, effective MW=581.92). ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.78 (1H, s), 8.72 (2H, m), 8.13 (4H, m), 7.70 (1H, d, J=7.1), 7.58 (2H, m), 7.41 (2H, m), 7.27 (1H, s), 6.89 (1H, t, J=4.2), 2.84 (1H, m), 0.72 (2H, m), 0.56 (2H, m). ESIMS ($M+H^+$): 396.1.

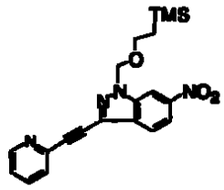
Example 3(k) N-(2-Methyl-allyl)-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



A solution of 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (50.0 mg, 0.084 mmol), 2-methyl-allylamine (16.4 µL, 0.17 mmol), triethylamine (58 µl, 0.42 mmol), dissolved in DMF (0.8 mL), was treated with HATU (48 mg, 0.13 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 45 mg (91%) of the title compound as a TFA salt (1.6 H_2O, 1.3 TFA, effective MW=586.53). ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.78 (1H, s), 8.72 (2H, m), 8.13 (4H, m), 7.70 (1H, d, J=7.1), 7.58 (2H, m),

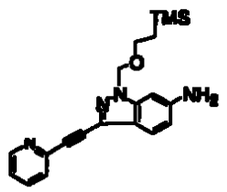
7.41 (2H, m), 7.27 (1H, s), 7.06 (1H, d, J=7.1), 6.91 (1H, t, J=7.5), 4.42 (1H, m), 2.22 (2H, m), 2.08 (2H, m), 1.68 (2H, m). ESIMS ($M+H^+$): 410.1.

Example 3(l) 6-Nitro-3-pyridin-2-ylethynyl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazole



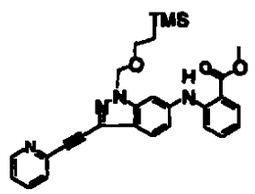
A mixture of 3-Iodo-6-nitro-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazole (838mg, 2.0 mmol), 2-ethynyl-pyridine (242 µL, 2.4 mmol), and triethylamine (6.0 mL), were degassed and flushed with argon, then treated with CuI (8 mg, 0.042 mmol), and $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (16 mg, 0.023mmol). The resulting mixture was stirred overnight at room temperature, at which time HPLC indicated all starting material had been consumed. The mixture was purified by stripping of volatiles under high vacuum, then passing through a plug of silica eluted with ethyl acetate. The resulting product was used in the next step without further purification. ESIMS ($M+H^+$): 395.1.

Example 3(m) 3-Pyridin-2-ylethynyl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamine



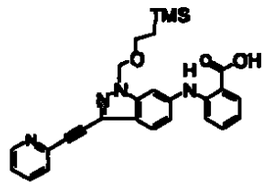
A mixture of 6-Nitro-3-pyridin-2-ylethynyl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazole (2 mmol), $SnCl_2$ (1.37g, 6.0 mmol), water (0.5 mL), and MeOH (10 mL), were stirred in a 60 deg C oil bath for 30 min at which time HPLC indicated complete reduction. The resulting mixture was stripped of methanol, suspended in EtOAc (50 mL) and diluted with 1M NaOH (18 mL). The resulting emulsion was gently extracted EtOAc (10 x 25 ml). The combined organics were extracted with 1M Na_2CO_3, brine, dried over $MgSO_4$, concentrated and filtered through a pad of silica eluted with EtOAc. The yield of crude product for two steps was 701 mg, 96% mass recovery. ESIMS ($M+H^+$): 365.1.

Example 3(n) 2-[3-Pyridin-2-ylethynyl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester



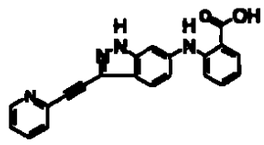
A mixture of 3-Pyridin-2-ylethynyl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamine (560 mg, 1.54 mmol), 2-bromomethylbenzoate (647.5 µL, 4.61 mmol), biphenyl-2-yl-dicyclohexyl-phosphane (107.8 mg, 0.308 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (70.5 mg, 0.0768 mmol), K_3PO_4 (816 mg, 3.844 mmol), and dimethoxyethane (1.7 ml), were vacuum flushed with nitrogen, then heated in an oil bath at 70 deg C for 24h. The black mixture was diluted with methylene chloride, and filtered, concentrated, and chromatographed (20% to 40% ethylacetate/hexanes). Yield of yellow/orange oil was 260 mg, 35% for three steps.

Example 3(o) 2-[3-Pyridin-2-ylethynyl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid



2-[3-Pyridin-2-ylethynyl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester (253mg, 0.517 mmol), was added to a solution of NaOH (62 mg, 1.55 mmol), dissolved in THF (1.0 mL), MeOH (2.25 mL), and water (0.5 mL). The reaction was stirred at room temperature for 1h, at which time HPLC indicated that all starting material had been consumed. The reaction was neutralized with 1N HCL, extracted with ethylacetate, which was then washed with brine and dried with $MgSO_4$. After concentrating under vacuum, 249 mg of yellow solid was obtained (99% mass recovery). This material was used without further purification. ESIMS (M-H$^-$): 483.0.

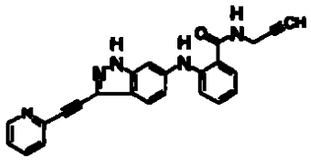
Example 3(p) 2-[3-Pyridin-2-ylethynyl-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid



A solution of 2-[3-Pyridin-2-ylethynyl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (231 mg, 0.477), 1M tetrabutylammonium fluoride in THF (3.8 mL, 3.816 mmol), and ethylenediamine (127 µL, 1.908 mmol), were stirred in an oil bath at 80 deg C for 6h. The reaction was quenched with acetic acid (218 µL, 3.816 mmol), diluted with water, and extracted with EtOAc (10 x 50 mL). The combined organics

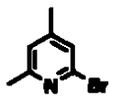
were washed with brine and dried over $MgSO_4$. After concentrating a solid forms which was triturated with CH_2Cl_2, giving the product as a yellow powder (124 mg, 73%). ESIMS ($M-H^+$): 353.0.

Example 3(q) N-Prop-2-ynyl-2-[3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



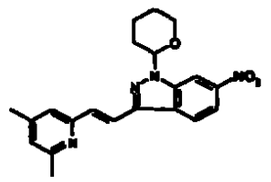
A solution of 2-(3-Pyridin-2-ylethynyl-1H-indazol-6-ylamino)-benzoic acid (41 mg, 0.117 mmol), propargylamine (24 µL, 0.35 mmol), triethylamine (81 µl, 0.58 mmol), dissolved in DMF (0.5 mL), was treated with HATU (89 mg, 0.233 mmol). The mixture was stirred overnight, then purified by reverse phase HPLC yielding 27 mg (59%) of the title compound as a yellow solid. ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 9.78 (1H, s), 8.99 (1H, m), 8.61 (1H, d, J=2.1), 7.88 (1H, s), 7.72 (3H, m), 7.43 (4H, m), 7.29 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=7.3), 6.91 (1H, t, J=5.2), 4.04 (2H, s), 3.04 (1H, s). ESIMS ($M+H^+$): 392.1.

Example 4(a): 2-Bromo-4,6-dimethyl-pyridine.



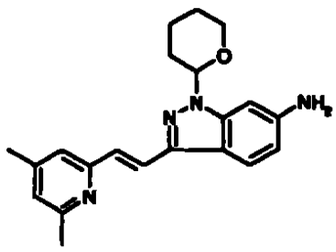
A solution of 48% HBr (aq) (Aldrich, 65 mL, 1.2 mol, 10 eq) was cooled to –5°C and treated with 4,6-dimethyl-pyridin-2-ylamine (Aldrich, 15.0 g, 0.12 mol. 1.0 eq). The thick white salt mixture was stirred with a mechanical stirrer while bromine (Aldrich, 19.7 mL, 0.38 mol, 3.1 eq) was added dropwise. The resultant red mixture was treated with an aqueous solution (32 mL H_2O) of $NaNO_2$ (Aldrich, 22.1 g, 0.32 mol, 2.6 eq) over one hour. The temperature was maintained below 5°C during the nitrite addition, and then gradually warmed to 20°C over 2 hours. The reaction mixture was adjusted to pH 14 with NaOH (aq), and extracted with MTBE. The organic extracts were washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product (29 g of a red oil) was purified by flash chromatography (silica, 350 g) and eluted with 2-7% ethyl acetate-cyclohexane, which gave an orange oil (11.0 g, 48%). ^1H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 7.30 (1H, s), 7.13 (1H, s), 2.39 (3H, s), 2.26 (3H, s). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 75 MHz) δ 159.4, 151.3, 140.9, 125.7, 124.0, 23.7, 20.3. ESI m/z 186/188 $(M + H)^+$.

Example 4(b): 3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-6-nitro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazole



A suspension of 2-bromo-4,6-dimethylpyridine (2.42g, 13 mmol), 3-vinyl-6-nitro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazole (2.37g, 8.67 mmol), palladium acetate (0.145g, 0.65mmol), tri-ortho-tolylphosphine (0.791g, 2.6 mmol), and diisopropylethylamine (2.4 mL, 13.8mmol) in aqueous DMF (85%, 34.5 mL) was degassed with Argon bubbling for 5 minutes followed by sonication for 5 minutes before heating in microwave apparatus (300 watts, 10% power) at 110°C for 40 minutes. After cooling, the mixture was dropped into cold water. The resulting yellow ppt was collected by filtration. The solids were dissolved in ethyl acetate, dried (sodium sulfate), and concentrated under reduced pressure. The residue was purified on silica gel using a gradient of 0 to 20% ethyl acetate in a mixture of chloroform and hexanes (1:1) as eluent. Product from chromatography was triturated with MTBE/hexanes to obtain clean product as yellow solid. Mother liquor was repurified in a similar fashion on silica gel followed by trituration to obtain more clean product in a 68% yield. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.54 (1H, s), 8.15 (1H, d, J=9.4 Hz), 8.08 (1H, dd, J = 9.04, 1.9 Hz), 7.87 (1H, d, J=16.6 Hz), 7.55 (1H, d, J=16.6 Hz), 7.14 (1H, s), 6.90 (1H, s), 5.82 (1H, dd, J = 9.0, 3.0 Hz), 4.08-4.01 (1H, m), 3.84-3.76 (1H, m), 2.56 (3H, s), 2.62-2.54 (1H, m), 2.34 (3H, s), 2.24-2.10 (2H, m), 1.88-1.68 (3H, m).

Example 5: 3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamine

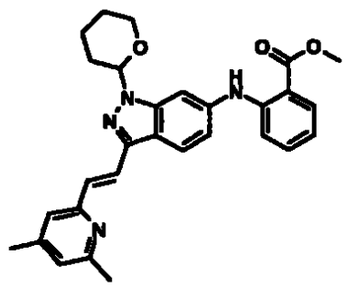


A suspension of 3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-6-nitro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole (4.22g, 11.16mmol), iron powder (2.71g, 48.51mmol) and sat. aq. NH_4Cl (25ml) in 25 ml of ethanol was heated at 45°C for 18hr. The reaction was cooled and

filtered through filter paper washing with methanol. The solvents were removed under reduced pressure and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2x). The combined organic layers were washed with brine, dried ($MgSO_4$) and concentrated under reduced pressure to give 4.02g (quantitative) of a rust colored solid and was used without further purification.

^{1}H NMR (DMSO-d6) δ 7.79 (1H, s), 7.74 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.35 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.29 (1H, s), 6.96 (1H, s), 6.63 (2H, m), 5.57 (1H, dd, J = 2.4, 9.5 Hz), 5.44 (2H, broad s), 3.88 (1H, m), 3.67 (1H, m), 2.45 (3H, s), 2.37 (1H, m), 2.29 (3H, s), 1.99 (2H, m), 1.73 (1H, m), 1.57 (2H, m).

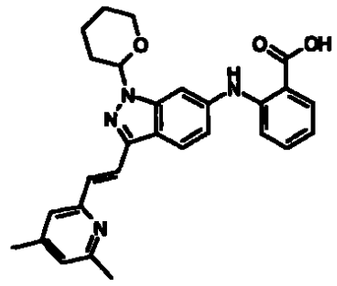
Example 6: 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester



A stirred suspension of 3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamine (870mg, 2.5mmol), 2-Bromo-benzoic acid methyl ester (0.44ml, 3.12mmol), R-BINAP (78mg, 0.125mmol), $Pd_2(dba)_3$ (29mg, 0.03mmol) and Cesium Carbonate (1.22g, 3.75mmol) in toluene(6ml) was degassed and heated at 100°C for 18hr. The reaction mixture was cooled, poured into sat. $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc (2x). The combined organic layers were washed with brine, dried ($MgSO_4$) and concentrated under reduced pressure. The residue was flash chromatographed on silica gel eluting a gradient of 5-10% EtOAc inCH_2Cl_2 to give 964mg (80%) of a yellow foam.

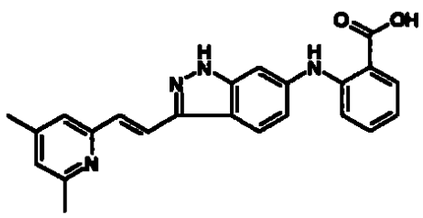
^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.49 (1H, s), 8.13 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.94 (1H, dd, J = 1.5, 8.0 Hz), 7.85 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.58 (1H, d, J = 1.5 Hz), 7.48 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.47 (1H, m), 7.37 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.34 (1H, s), 7.19 (1H, dd, J = 1.7, 8.7 Hz), 6.99 (1H, s), 6.89 (1H, t, J = 8.1 Hz), 5.83 (1H, d, J = 7.2 Hz), 3.88 (3H, s), 3.75 (1H, m), 2.48 (3H, s), 2.41 (2H, m), 2.31 (3H, s), 2.02 (2H, m), 1.75 (1H, m), 1.59 (2H, m). *Anal.* Calcd for $C_{29}H_{30}N_4O_3 \cdot 0.15$ EtOAc: C, 71.71; H, 6.34; N, 11.30. Found: C, 71.60; H, 6.14; N, 11.37.

Example 7: 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid



To a stirred solution of 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester (1.98g, 4.11mmol) in THF:MeOH (12ml, 3:1) was added Potassium hydroxide (1.15g, 20.5mmol) dissolved in H_2O (3ml). The reaction was heated at 70°C for 2hr, cooled, concentrated under reduced pressure to about 5ml and diluted with more water. The solution was neutralized with 2N HCl and the precipitate was collected by filtration and washed with water to give 2.00g (quantitative) of a bright yellow solid. ^{1}H NMR (DSMO-d_6) δ13.12 (1H, broad s), 9.82 (1H, s), 8.13 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.95 (1H, dd, J = 1.5, 8.0 Hz), 7.89 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.60 (1H, s), 7.50 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.46 (1H, d, J = 6.9 Hz), 7.37 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.20 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.06 (1H, s), 6.86 (1H, t, J = 6.9 Hz), 5.85 (1H, d, J = 7.3 Hz), 3.82 (2H, m), 2.50 (3H, s, obscured by dmso), 2.48 (2H, m), 2.34 (3H, s), 2.03 (2H, m), 1.76 (1H, m), 1.59 (2H, m). *Anal.* Calcd for $C_{28}H_{28}N_4O_3 \cdot 0.5$ KOH: C, 67.72; H, 5.79; N, 11.28. Found: C, 67.65; H, 5.88; N, 11.07.

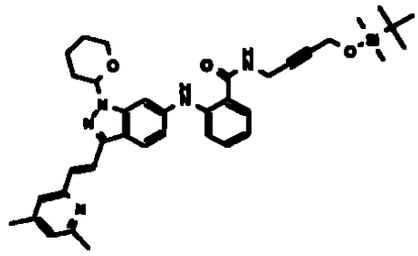
Example 8: 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino)-benzoic acid p-toluene sulfonate



A mixture of 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid (2 mmol) and p-toluene sulfonic acid (10 mmol) in aqueous methanol (90%, 20mL) was stirred at 70C for 18 hr. After cooling, the resulting thick yellow slurry was filtered and the solids washed with methanol to give 2-[3-[2-(4,6-

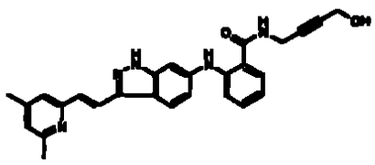
Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino)-benzoic acid as the tosylate salt in 85% yield as a pale yellow solid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 13.43 (1H, s), 9.78 (1H, s), 8.24-8.19 (2H, m), 8.09 (1H, d, J = 9.04 Hz), 7.95 (1H, dd, J = 7.9, 1.1 Hz), 7.62-7.55 (2H, m), 7.49-7.38 (5H, m), 7.20 (1H, dd, J=9.0, 1.9 Hz), 7.09 (2H, d, J= 8.3 Hz), 6.86 (1H, dt, J = 7.9, 1.1 Hz), 2.67 (3H, s), 2.54 (3H, s), 2.27 (3H, s).

Example 9: N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 33(a) step (v), in US Patent Application Serial Number 09/609,335, filed June 30, 2000, herein incorporated by reference in its entirety for all purposes, except using 4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynylamine and 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.56 (1H, s), 9.01 (1H, t, J = 5.7 Hz), 8.06 (1H, d, J =8.7 Hz), 7.81 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.66 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.41 (4H, m), 7.32 (1H, s), 7.09 (1H, dd, J = 1.8, 8.7 Hz), 6.98 (1H, s), 6.89 (1H, t, J = 8.0 Hz), 5.79 (1H, dd, J = 2.4, 9.2 Hz), 4.28 (2H, s), 4.09 (2H, m), 3.86(1H,m), 3.72 (1H, m), 2.46 (3H, s), 2.42 (1H, m), 2.30 (3H, s), 2.08 (2H, m), 1.74 (1H, m), 1.57 (2H, m), 0.80 (9H, s), 0.03 (6H, s). *Anal.* Calcd for $C_{38}H_{47}N_5O_3Si \cdot 0.7\ H_2O$: C, 68.89; H, 7.36; N, 10.57. Found: C, 68.99; H, 7.36; N, 10.21.

Example 10: 2-[3-[(E)-2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino)-N-(4-hydroxy-but-2-ynyl)-benzamide

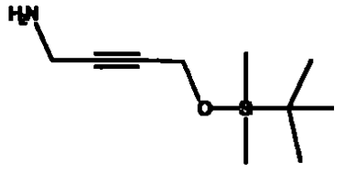


A stirred solution of N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide (737mg, 1.13mmol) and p-Toluene-sulfonic acid (6.2ml, 12% in HOAc) was heated at

70°C for 2hr. The reaction was cooled, and cautiously poured into sat. $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc (2x). The combined organic layers were washed with brine (2x), dried ($MgSO_4$) and concentrated under reduced pressure. The residue was flash chromatographed on silica gel eluting CH_2Cl_2:EtOAc: MeOH (1:1:0.1) to give 225mg (44%) of a white solid. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 12.91 (1H, s), 9.84 (s, 1H), 9.01 (1H, t, J = 5.3 Hz), 8.07 (1H, d, J =8.7 Hz), 7.84 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.70 (1H, d, J = 7.2 Hz), 7.43 (3H, m), 7.31 (1H, s), 7.26 (1H, s), 7.02 (1H, dd, J = 1.6, 8.7 Hz), 6.97 (1H, s), 6.89 (1H, t, J = 6.7 Hz), 5.12 (1H, t, J = 5.8 Hz), 4.10 (2H, d, J = 5.3 Hz), 4.07 (2H, d, J = 5.8 Hz), 2.47 (3H, s), 2.31 (3H, s).

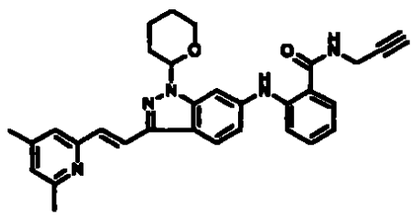
Anal. Calcd for $C_{27}H_{28}N_5O_2 \cdot 1.1\ H_2O$: C, 68.80; H, 5.82; N, 14.86. Found: C, 68.72; H, 5.81; N, 14.65.

Example 11: 4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynylamine



To an ice cold, stirred solution of the known 4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-yn-1-ol (3.14g, 15.7mmol) in THF (50ml) was added DBU (2.6ml, 17.4mmol) and DPPA (3.8ml, 17.6mmol). The solution was warmed to room temperature and stirred under an inert atmosphere overnight. The reaction was poured into sat. $NaHCO_3$ and the layers separated. The aqueous layer was re-extracted with EtOAc (2x) and the combined organic layers were dried (Na_2SO_4), and concentrated under vacuum. Triphenylphosphine (4.61g, 17.6mmol) was added to this crude azide dissolved in THF (50ml), followed by addition of H_2O (0.44ml). The resultant solution was stirred overnight at room temperature, concentrated under reduced pressure and the residue was slurried in a 1:1 mixture of Et_2O/pet ether. The solids were removed and the filtrate was concentrated and purified by flash chromatography on silica gel eluting CH_2Cl_2/MeOH (19:1) to give an amber oil. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 4.19 (2H, t, J = 1.9Hz), 3.33 (2H, t, J = 1.9Hz), 0.79 (9H, s), 0.00 (6H, s).

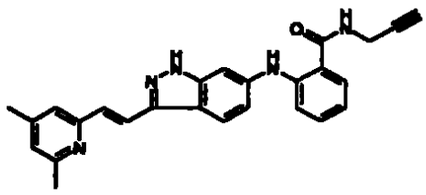
Example 12: 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-N-prop-2-ynyl-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and propargyl amine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.87 (1H, s), 9.04 (1H, t, J = 5.8 Hz), 8.08 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.83 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.69 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.44 (4H, m), 7.34 (1H, s), 7.12 (1H, dd, J = 1.7, 8.7 Hz), 6.99 (1H, s), 6.91 (1H, t, J = 5.8 Hz), 5.81 (1H, dd, J = 2.4, 9.2 Hz), 4.07 (2H, dd, J = 2.5, 5.7 Hz), 3.88 (1H,m), 3.74 (1H, m), 3.12 (1H, t, J = 2.5 Hz), 2.48 (3H, s), 2.43 (1H, m), 2.31 (3H, s), 2.01 (2H, m), 1.74 (1H, m), 1.58 (2H, m).

Anal. Calcd for $C_{31}H_{31}N_5O_2 \cdot 1.1\ H_2O \cdot 0.3$ TBME: C, 70.73; H, 6.72; N, 12.69. Found: C, 70.56; H, 6.45; N, 12.49.

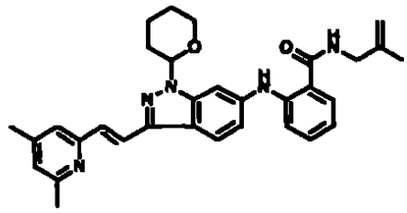
Example 13: N-(prop-2-ynyl)-2-{3-[(E)-2-(2,4-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 7 except using *N*-(3-Cyclopropyl-prop-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide instead of *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 12.90 (1H, s), 9.78 (1H, s), 9.01 (1H, t, J = 5.3 Hz), 8.06 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.84 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.68 (1H, dd, J = 7.9, 1.1 Hz), 7.45-7.36 (3H, m), 7.30 (1H, s), 7.25 (1H, d, J = 1.5 Hz), 7.01 (1H, dd, J = 8.7, 1.9 Hz),

6.96 (1H, s), 6.86 (1H, dt, J = 6.8, 1.9 Hz), 4.04 (2H, dd, J = 5.6, 2.6 Hz), 3.11 (1H, t, J = 2.6 Hz), 2.46 (3H, s), 2.29 (3H, s).

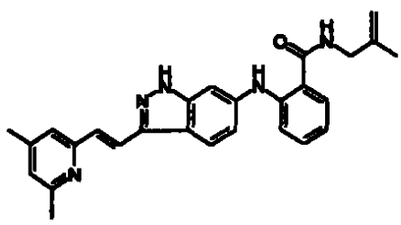
Example 14: 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-N-(2-methyl-allyl)-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and 2-Methyl-allylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.87 (1H, s), 8.82 (1H, t, J = 5.8 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.82 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.74 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.43 (4H, m), 7.33 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 8.7 Hz), 6.99 (1H, s), 6.92 (1H, t, J = 7.8 Hz), 5.80 (1H, dd, J = 2.2, 9.2 Hz), 4.83 (2H, d, J = 11.8 Hz), 3.83 (4H,m), 2.47 (3H, s), 2.44 (1H, m), 2.31 (3H, s), 2.00 (2H, m), 1.75 (1H, m), 1.73 (3H, s), 1.58 (2H, m).

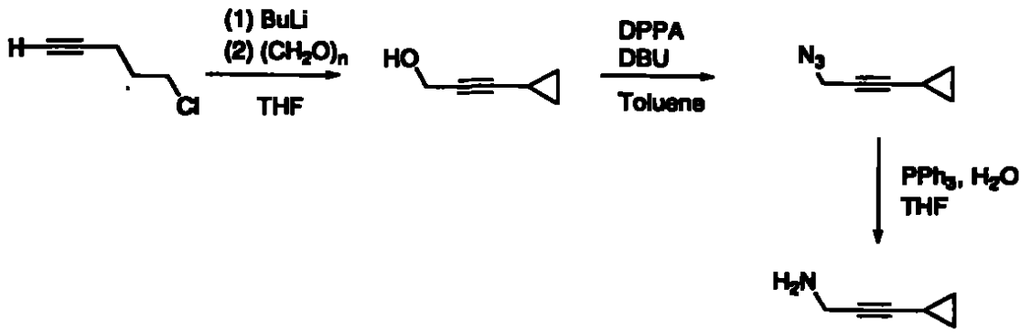
Anal. Calcd for $C_{32}H_{38}N_6O_2 \cdot 1.09\ H_2O$: C, 71.00; H, 6.92; N, 12.94. Found: C, 71.40; H, 6.89; N, 12.54.

Example 15: 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino]-N-(2-methyl-allyl)-benzamide

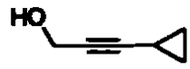


Prepared in a similar manner to that described for Example 7 except using *N*-(2-Methyl-allyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide instead of *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.89 (1H, s), 9.75 (1H, s), 8.79 (1H, t, J=5.6 Hz), 8.05 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.85 (1H, d, J=16.2 Hz), 7.74 (1H, d, J=7.9 Hz), 7.45-7.33 (4H, m), 7.23 (1H, d, J= 1.5 Hz), 7.00-6.97 (2H, m), 6.90 (1H, dt, J = 7.9, 1.1 Hz), 4.81 (2H, d, J= 11.3 Hz), 3.81 (2H, d, J=5.6 Hz), 2.47 (3H, s), 2.30 (3H, s), 1.71 (3H, s).

<u>Alternative Synthetic Scheme</u>

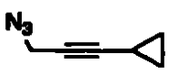


Example 16(a):Cyclopropyl-prop-2-yn-1-ol



To a round bottom flask containing 70 mL anhydrous THF cooled in –10°C ice bath was added 65.6 mL 1.6M BuLi in hexanes (105 mmol). 5-Chloro-pent-1-yne (5.13 g, 50 mmol) was introduced slowly while maintaining temperature at –10 to 0°C. The mixture was stirred at 0°C for two hours under argon. Paraformaldehyde (3 g, 100 mmol) was added as a solid. The mixture was warmed up slowly to room temperature and stirred overnight under argon. The next day, water was added and c.a. 50 mL 1 N aqueous HCl was added. The mixture was extracted with ethyl acetate and the combined organic layers was washed with brine, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated. The crude product was purified by column eluting with 20% Et_2O in hexanes to give 3 g 3-cyclopropyl-prop-2-yn-1-ol as an oil (62% yield). ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 4.22 (dd, 2H, J = 6.04, 2.01 Hz), 1.46 (t, 1H, J = 6.04 Hz), 1.26 (m, 1H), 0.77 (m, 2H), 0.70 (m, 2H).

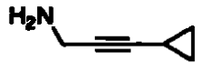
Example 16(b): 3-Cyclopropyl-prop-2-ynylazide



3-Cyclopropyl-prop-2-yn-1-ol (3.28 g, 34.1 mmol) was dissolved in 40 mL toluene, DPPA (11.26 g, 40.9 mmol) was added, followed with DBU (6.24 g, 40.9 mmol) while maintaining temperature with a water bath. The mixture was stirred at room temperature for one hour and was diluted with 100 mL hexane and 15 mL CH_2Cl_2. The mixture was washed with water four times and once with brine, dried over Na_2SO_4, filtered and

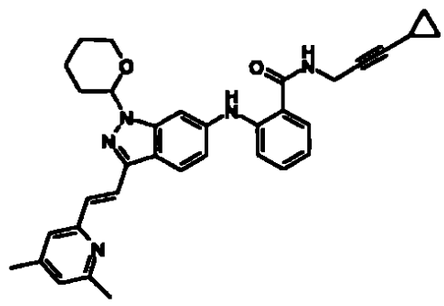
concentrated under rotvap with cold water bath to remove most of organic solvent leaving some toluene (product volatile). The residual oil was used for the next step.
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 3.85 (s, 2H), 1.26 (m, 1H), 0.80 (m, 2H), 0.72 (m, 2H).

Example 16(c): 3-Cyclopropyl-prop-2-ynylamine



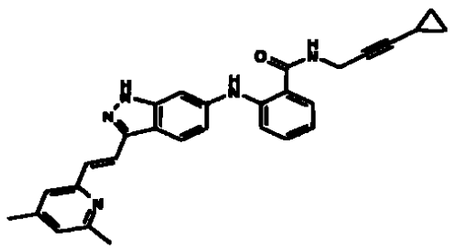
3-Cyclopropyl-prop-2-ynylazide (c.a. 34 mmol) was dissolved in 100 mL THF, 1 mL water was added, followed with addition of PPh_3 (13.37 g, 51 mmol) as a solid while maintaining temperature with a water bath. The mixture was stirred at room temperature for one hour. 150 mL 1N aqueous HCl was added to the mixture. The mixture was washed with methylene chloride three times. The aqueous layer was basified with 5 N NaOH to pH 10–12. The mixture was extracted with ethyl acetate. The aqueous layer was checked with TLC staining to monitor progress of extraction of amine to the organic phase. The combined organic layer was dried over Na_2SO_4, filtered, and concentrated to give 1.62 g desired product (product volatile, contains residual EtOAc solvent) (50 % yield for two steps). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 3.37 (d, 2H, J = 2 Hz), 1.22 (m, 1H), 0.74 (m, 2H), 0.65 (m, 2H).

Example 17: *N*-(3-Cyclopropyl-prop-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide



Was prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid E and 3-Cyclopropyl-prop-2-ynylamine. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9.51 (1H, s), 7.97 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.81 (1H, d, J = 16.6 Hz), 7.51-7.42 (3H, m), 7.34-7.29 (2H, m), 7.16 (1H, s), 7.11 (1H, dd, J = 9.0, 1.9 Hz), 6.85 (1H, s), 6.81 (1H, dt, J = 7.2, 1.1 Hz), 6.23 (1H, t, J = 7.2 Hz), 5.61 (1H, dd, J = 9.0, 2.6 Hz), 4.17 (2H, dd, J = 5.3, 2.3 Hz), 4.07-4.00 (1H, m), 3.75-3.66 (1H, m), 2.63-2.50 (1H, m), 2.54 (3H, s), 2.32 (3H, s), 2.20-2.02 (2H, m), 1.79-1.62 (3H, m), 1.29-1.19 (1H, m), 0.77-0.67 (4H, m).

Example 18: N-(3-Cycloprop-2-ynyl)-2-{3-[(E)-2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)--vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 7 above, except using 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-N-prop-2-ynyl-benzamide instead of *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 12.90 (1H, s), 9.79 (1H, s), 8.91 (1H, t, J = 5.6 Hz), 8.06 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.83 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.68 (1H, dd, J = 7.9, 1.1 Hz), 7.49-7.38 (3H, m), 7.29 (1H, s), 7.25 (1H, d, J = 1.9 Hz), 6.99 (1H, dd, J = 9.0, 2.3 Hz), 6.96 (1H, s), 6.88 (1H, dt, J = 7.9, 1.5 Hz), 4.00 (2H, dd, J = 5.6, 1.9 Hz), 2.48 (3H, s), 2.29 (3H, s), 1.31-1.23 (1H, m), 0.75-0.70 (2H, m), 0.57-0.52 (2H, m).

Example 19(a): 2-Butyne-1,4-diol, monoacetate



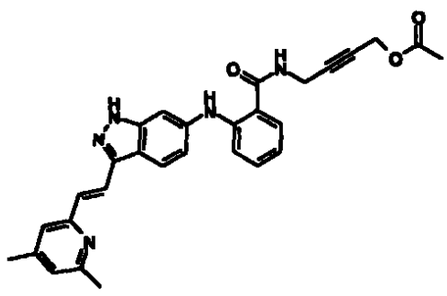
To a solution of butyne-1,4-diol (5g, 58 mmol) in dry THF at RT was added portion-wise sodium hydride (60% dispersion in oil, 2.32g, 58mmol). After 4.3 hr, acetyl chloride (4.12 mL, 58 mmol) was added. After stirring at RT for 22 hr, the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was concentrated twice from toluene before purification on silica gel using ethyl acetate/dichloromethane (1:3) as eluent to give 2-Butyne-1,4-diol, monoacetate as an oil in 49% yield. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 5.23 (1H, bs), 4.70 (2H, t, J= 1.8 Hz), 4.09 (2H, s), 2.03 (3H, s).

Example 19(b): Acetic acid 4-amino-but-2-ynyl ester



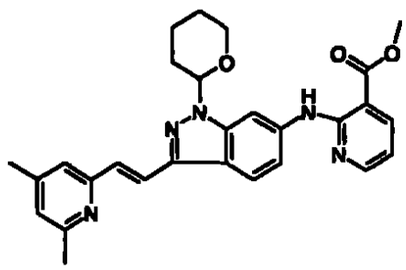
Prepared in a similar manner as described in Example 8 except 2-Butyne-1,4-diol monoacetate was used instead of 4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-yn-1-ol. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 4.77 (2H, s), 4.20 (2H, s), 2.04 (3H, s).

Example 20: Acetic acid 4-(2-{3-[(E)-2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1*H*-indazol-6-ylamino}-benzoylamino)-but-2-ynyl ester



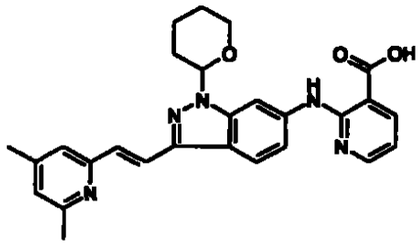
Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl] 1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid p-toluene sulfonate and Acetic acid 4-amino-but-2-ynyl ester. ^{1}H NMR (CD_3CN): δ 11.00 (1H, bs), 9.59 (1H, s), 7.99 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.86 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.58 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.49-7.37 (4H, m), 7.32 (1H,s), 7.21 (1H, s), 7.06 (1H, dd, J = 8.8, 1.8 Hz), 6.96 (1H, s), 6.90 (1H, t, J = 7.8 Hz), 4.63 (2H, s), 4.16 (2H, d, J = 5.6 Hz), 2.49 (3H, s), 2.32 (3H, s), 2.01 (3H, s).

Example 21: 2-[3-[(E)-2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinic acid methyl ester



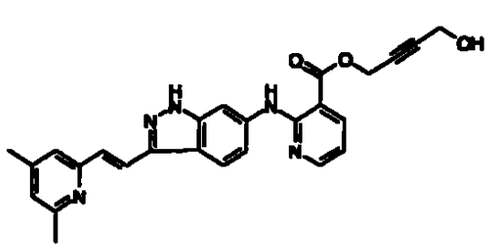
Prepared in a similar manner to that described for Example 3 above except using 2-Bromo-nicotinic acid methyl ester instead of 2-bromo-benzoic acid methyl ester. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 10.36 (1H, s), 8.50 (1H, dd, J = 4.7, 1.9 Hz), 8.36 (1H, d, J=1.4 Hz), 8.30 (1H, dd, J = 7.8, 2.0 Hz), 8.08 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.83 (1H, d, J=16.4 Hz), 7.48 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.44 (1H, s), 7.33 (1H, s), 6.96-6.93 (2H, m), 5.80 (1H, d, J = 7.0 Hz), 2.93 (3H, s), 3.93-3.90 (1H, m), 3.80-3.75 (1H, m), 2.46 (3H, s), 2.30 (3H, s), 2.10-1.97 (2H, m), 1.89-1.60 (3H, m).

Example 22: 2-[3-[(E)-2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-nicotinic acid



Prepared in a similar manner to that described for Example 4 except using 2-[3-[(E)-2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinic acid methyl ester instead of 2-[3-[2-(4,6-dim ethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 10.73 (1H, s), 8.49 (1H, d, J = 1.9 Hz), 8.45 (1H, s), 8.31 (1H, dd, J = 7.7, 1.8 Hz), 8.16-7.97 (3H, m), 7.70 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.50 (1H, d, J=8.8 Hz), 7.37 (1H, s), 6.96 (1H, dd, J = 7.7, 4.8 Hz), 5.87 (1H, d, J = 8.4 Hz), 3.95-3.90 (1H, m), 3.79-3.70 (1H, m), 2.63 (3H, s), 2.47 (3H, s), 2.07-1.99 (2H, m), 1.81-1.62 (3H, m).

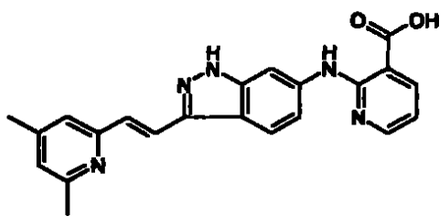
Example 23: 2-[3-[(E)-2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino]-N-(4-hydroxy-but-2-ynyl)-nicotinamide



A crude mixture of *N*-(4-Hydroxy-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinamide and *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-

pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinamide was prepared from 2-[3-[(E)-2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-nicotinic acid and 4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynylamine in a similar fashion to that described for Example 6 above and subsequently converted to 2-[3-[(E)-2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino]-N-(4-hydroxy-but-2-ynyl)-nicotinamide in a similar fashion to that described for Example 7 except using a mixture of *N*-(4-Hydroxy-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinamide and *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinamide instead of *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 12.99 (1H, s), 11.21 (1H, s), 9.26 (1H, t, J = 5.3 Hz), 8.50 (1H, d, J = 1.9 Hz), 8.41 (1H, dd, J = 4.9, 1.9 Hz), 8.16 (1H, dd, J = 8.3, 1.9 Hz), 8.04 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.85 (1H, d, J = 16.6 Hz), 7.42 (1H, d, J = 16.6 Hz), 7.31 (1H,s), 7.08 (1H, dd, J = 8.7, 1.5 Hz), 6.96 (1H, s), 6.93 (1H, dd, J = 7.5, 4.9 Hz), 5.14 (1H, t, J = 5.6 Hz), 4.16 (2H, d, J = 5.6 Hz), 4.08 (2H, d, J = 7.2 Hz), 2.46 (3H, s), 2.30 (3H, s).

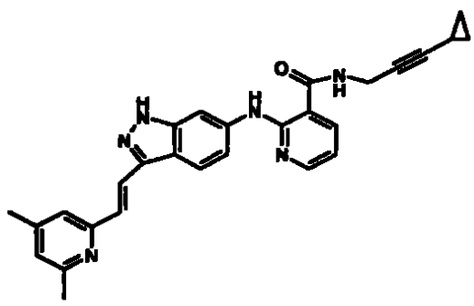
Example 24: 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinic acid p-toluene sulfonate



Prepared in a similar manner to that described for Example 5 except using 2-[3-[(E)-2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-nicotinic acid instead of 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid.

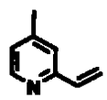
^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 13.49 (1H, s), 10.80 (1H, s), 8.63 (1H, d, J = 1.5 Hz), 8.49 (1H, dd, J = 4.8, 1.9 Hz), 8.31 (1H, dd, J = 7.7, 1.9 Hz), 8.24-8.19 (2H, m), 8.06 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.80-7.55 (2H, m), 7.46 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.22 (1H, dd, J = 8.8, 1.7 Hz), 7.09 (2H, d, J= 7.9 Hz), 6.95 (1H, dd, J = 7.7, 4.7Hz), 2.66 (3H, s), 2.54 (3H, s), 2.27 (3H, s).

Example 25: *N*-(3-Cyclopropyl-prop-2-ynyl)-2-[3-[(E)-2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinamide



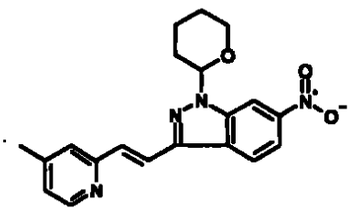
Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1*H*-indazol-6-ylamino]-nicotinic acid p-toluene sulfonate and 3-Cyclopropyl-prop-2-ynylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ13.01 (1H, s), 11.20 (1H, s), 9.19 (1H, bt), 8.51 (1H, s), 8.40 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.15 (1H, d, J = 7.5 Hz), 8.05 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.83 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.42 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.31 (1H, s), 7.05 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.96 (1H, s), 6.92 (1H, dd, J = 7.5, 4.9 Hz), 4.06 (2H, d, J = 4.14 Hz), 2.46 (3H, s), 2.29 (3H, s), 1.33-1.26 (1H, m), 0.77-0.72 (2H, m), 0.60-0.55 (2H, m).

Example 26: 4-Methyl-2-vinyl-pyridine



A yellow mixture of 2-bromo-4-methyl-pyridine (Aldrich, 5.2 g, 30.5 mmol, 1.0 eq), 2,6-di-tert-butyl-4-methyl-phenol (Aldrich, 67 mg, 0.3 mmol, 1mol%), tributyl-vinyl-stannane (Aldrich, 26.8 mL, 91.5 mmol, 3.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0) (Strem, 1.8 g, 1.5 mmol, 5mol%) in toluene (100 mL) was degassed and purged with argon. An amber solution was obtained after the mixture was warmed to 100 °C. The reaction mixture was quenched after 18 hours by the addition of 1.0 M HCl. The acidic extract was washed with ether, adjusted to pH 9 with solid sodium bicarbonate, and extracted with ethyl acetate. The organic extracts were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product (3.7 g of a brown oil) was purified by flash chromatography (silica) and eluted with 0-5% ethyl acetate-dichloromethane, which gave a clear oil (1.9 g, 53%). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 8.39 (1H, d, J = 4.9 Hz), 7.33 (1H, s), 7.10 (1H, dd, J = 5.0, 0.8 Hz), 6.77 (1H, dd, 17.5, 10.8 Hz), 6.20 (1H, dd, J = 17.5, 1.7 Hz), 5.44 (1H, dd, J = 10.8, 1.8 Hz), 2.31 (3H, s). ESIMS m/z 120 $(M + H)^+$.

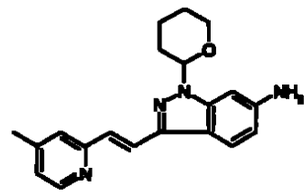
Example 27: 3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-6-nitro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole



A suspension of 4-Methyl-2-vinyl-pyridine (Example 23) (1.9g, 15.97mmol), 6-Nitro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-3-vinyl-1H-indazole (4.96g, 13.3mmol), $Pd(OAc)_2$ (149mg, 0.66mmol), P(o-tolyl)$_3$, and DIEA(3.5ml, 19.96mmol) in degassed DMF (50ml) was heated under argon at 100°C for 18hr. The reaction mixture was cooled and the solids removed by filtration washing with EtOAc. The filtrate was diluted wih EtOAc and washed with brine (2x), dried ($MgSO_4$) and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel eluting Hexanes: EtOAc (3:1) to give 3.40g (70%) of a bright yellow solid.

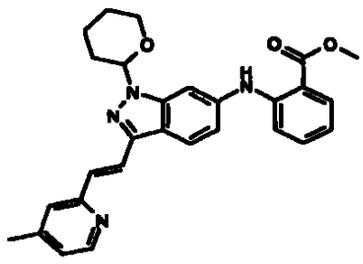
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.58 (1H, s), 8.50 (1H, d, J = 5.0 Hz), 8.11 (2H, m), 7.89 (1H, d, J = 16.3 Hz), 7.61 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 4.3 Hz), 5.83 (1H, dd, J = 2.6, 9.0 Hz), 4.06 (1H, m), 3.82 (1H, m), 2.58 (1H, m), 2.39 (3H, s), 2.18 (2H, m), 1.78 (3H, m). *Anal.* Calcd for $C_{20}H_{20}N_4O_3$: C, 65.92; H, 5.53; N, 15.38. Found: C, 65.80; H, 5.52; N, 15.15.

Example 28: 3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamine



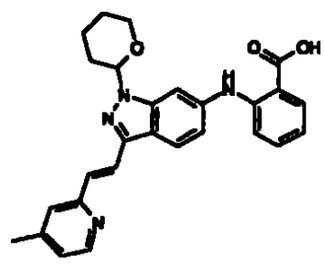
Prepared in a similar manner to that described for Example 2 except using [2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-6-nitro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole (Example 24) instead of 3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-6-nitro-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazole. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 8.43 (1H, d, J=4.8 Hz), 7.79-7.73 (2H, m), 7.50 (1H, s), 7.39 (1H, d, J=16.4 Hz), 7.09 (1H, d, J=4.8 Hz), 6.64-6.62 (2H, m), 5.57 (1H, dd, J = 9.8, 2.5 Hz), 5.48 (2H, bs), 3.92-3.85 (1H, m), 3.72-3.64 (1H, m), 2.43-2.34 (1H, m), 2.33 (3H, s), 2.07-2.00 (1H, m), 1.96-1.90 (1H, m), 1.79-1.66 (1H, m), 1.60-1.53 (2H, m).

Example 29: 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester



Prepared in a similar manner to that described for Example 3 except using 3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamine instead of 3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.48 (1H, s), 8.45 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.13 (1H, d, J=8.7 Hz), 7.93 (1H, dd, J = 8.3, 1.9 Hz), 7.86 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.58 (1H, d, J=1.9 Hz), 7.54-7.44 (3H, m), 7.36 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.18 (1H, dd, J = 8.7, 1.9 Hz), 7.11 (1H, d, J = 4.9 Hz), 6.87 (1H, t, J = 8.3 Hz), 5.83 (1H, dd, J = 9.4, 2.3 Hz), 3.87 (3H, 1H), 3.93-3.84 (1H, m), 3.77-3.69 (1H, m), 2.46-2.37 (1H, m), 2.34 (3H, s), 2.10-1.94 (2H, m), 1.81-1.53 (3H, m).

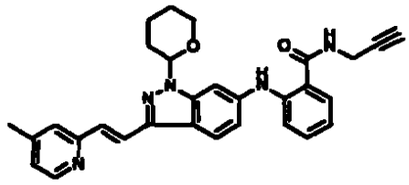
Example 30: 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid



Prepared in a similar manner to that described for Example 4 above except that 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester was used instead of 2-[3-[2-(4,6-Dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester (Example 3). ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 13.17 (1H, broad s), 9.83 (1H, s), 8.51 (1H, d, J = 5.2 Hz), 8.14 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.95 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.94 (dd, 1H, J = 1.5, 8.0 Hz), 7.73 (1H, s), 7.60 (1H, d, J = 1.5 Hz), 7.59 (1H, s), 7.54 (1H, s), 7.46 (1H, m), 7.37 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.23

(2H, m), 6.86 (1H, t, J = 6.9 Hz), 5.87 (1H, d, J = 7.6 Hz), 3.90 (1H, m), 3.76 (1H,m), 2.45 (1H,m), 2.41 (3H, s), 2.03 (2H, m), 1.77 (1H, m), 1.59 (2H, m).

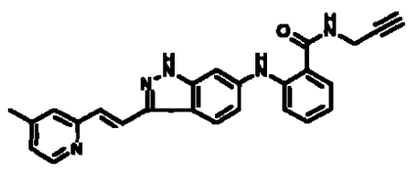
Example 31: 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-N-prop-2-ynyl-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using propargyl amine and 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.67 (1H, s), 9.03 (1H, t, J = 5.5 Hz), 8.48 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.08 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.88 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.69 (1H, d, J = 7.3Hz), 7.53 (1H, s), 7.44 (4H, m), 7.13 (2H, m), 6.91 (1H, t, J = 7.9 Hz), 5.81 (1H, dd, J = 2.2, 9.6 Hz), 4.07 (2H, dd, J =2.5, 5.5 Hz), 3.89 (1H,m), 3.75 (1H, m), 3.12 (1H, t, J = 2.5 Hz), 2.42 (1H, m), 2.36 (3H, s), 2.00 (2H, m), 1.75 (1H, m), 1.58 (2H, m).

Anal. Calcd for $C_{30}H_{29}N_5O_2 \cdot 0.25$ TBME: C, 73.07; H, 6.28; N, 13.64. Found: C, 72.95; H, 6.30; N, 13.64.

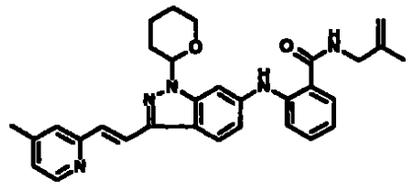
Example 32: 2-[3-[(E)-2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino]-N-prop-2-ynyl-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 7 except that 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-N-prop-2-ynyl-benzamide was used instead of N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.83,,s), 9.79 (1H, s), 9.02 (1H, t, J = 5.4 Hz), 8.45 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.08 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.88 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.69 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.45 (4H, m), 7.27 (1H, s),), 7.10 (1H, d, J = 4.9 Hz), 7.03 (1H, d, J = 8.8 Hz), 6.90 (1H, t, J = 7.9 Hz), 4.06 (2H, dd, J = 2.4, 5.4 Hz), 3.12 (1H, t, J = 2.4 Hz), 2.35 (3H, s).

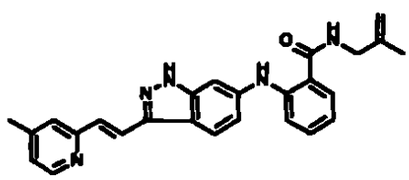
Anal. Calcd for $C_{25}H_{21}N_5O \cdot 0.35\ CH_2Cl_2$: C, 69.64; H, 5.00; N, 16.02. Found: C, 69.65; H, 5.15; N, 15.80.

Example 33: N-(2-Methyl-allyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-Methyl-allylamine and 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.86 (1H, s), 8.81 (1H, t, J = 5.5 Hz), 8.48 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.86 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.75 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.54 (1H, s), 7.50 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.43 (3H, m), 7.11 (2H, m), 6.92 (1H, t, J = 8.1 Hz), 5.81 (1H, dd, J = 2.5, 9.8 Hz), 4.83 (2H, d, J = 11.5 Hz), 3.81 (4H, m), 2.41 (1H, m), 2.35 (3H, s), 2.00 (2H, m), 1.76 (1H, m), 1.73 (3H, s), 1.58 (2H, m). *Anal.* Calcd for $C_{31}H_{33}N_5O_2$ • 0.80 TBME: C, 72.71; H, 7.43; N, 12.11. Found: C, 72.43; H, 7.57; N, 12.02.

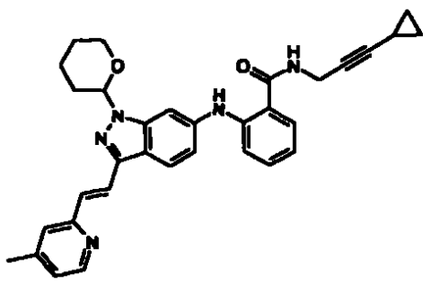
Example 34: N-(2-Methyl-allyl)-2-{[(E)-2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 7 except that N-(2-Methyl-allyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide was used instead of N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.90 (1H, s), 9.76 (1H, s), 8.80 (1H, t, J = 5.5 Hz), 8.45 (1H, d, J = 5.1 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.88 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.75 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.51 (1H, s), 7.48 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.43 (2H, m), 7.24 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 4.9 Hz), 7.00 (1H, dd, J = 1.9, 8.9 Hz), 6.91 (1H, t, J = 8.1 Hz), 4.82 (2H, d, J = 11.3 Hz), 3.83 (2H, d, J = 5.8 Hz), 2.35 (3H, s), 1.73 (3H, s).

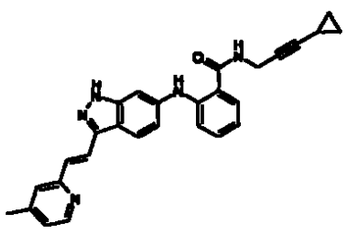
Anal. Calcd for $C_{28}H_{25}N_5O$ • 0.20 H_2O: C, 73.11; H, 5.99; N, 16.40. Found: C, 73.13; H, 6.03; N, 16.13.

Example 35: *N*-(3-Cyclopropyl-prop-2-ynyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide



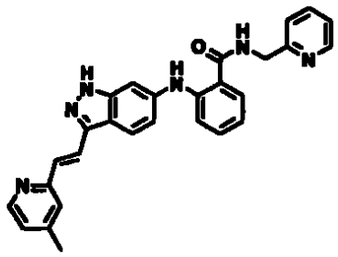
Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and 3-Cyclopropyl-prop-2-ynylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9.88 (1H, bs), 8.93 (1H, bt), 8.46 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.08 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.85 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.69 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.54-7.40 (5H, m), 7.14-7.11 (2H, m), 6.90 (1H, t, J = 6.1 Hz), 5.81 (1H, d, J = 7.5 Hz), 4.02 (2H, d, J = 3.6 Hz), 3.95-3.85 (1H, m), 3.79-3.72 (1H, m), 2.49-2.35 (1H, m), 2.35 (3H, s), 2.15-2.01 (2H, m), 1.87-1.55 (3H, m), 1.30-1.25 (1H, m), 0.77-0.70 (2H, m), 0.59-0.54 (2H, m).

Example 36: *N*-(3-Cycloprop-2-ynyl)-2-[3-[(*E*)-2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide



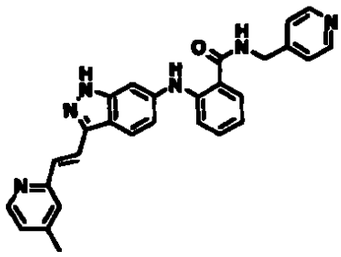
Prepared in a similar manner to that described for Example 7 above except using *N*-(3-cycloprop-2-ynyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide instead of *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 12.91 (1H, s), 9.79 (1H, s), 8.91 (1H, t, J = 5.6 Hz), 8.44 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.06 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.87 (1H, d, J = 16.6 Hz), 7.67 (1H, dd, J = 7.9, 1.5 Hz), 7.50-7.35 (4H, m), 7.24 (1H, d, J = 1.9 Hz), 7.09 (1H, d, J = 4.9 Hz), 7.00 (1H, dd, J = 8.7, 1.5 Hz), 6.88 (1H, dt, J = 4.1, 1.5 Hz), 4.00 (2H, dd, J = 5.3, 1.9 Hz), 2.34 (3H, s), 1.31-1.23 (1H, m), 0.75-0.69 (2H, m), 0.56-0.52 (2H, m).

Example 37: 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino]-N-pyridin-2-ylmethyl-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 and Example 7 above except using 2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and C-Pyridin-2-yl-methylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 12.91 (1H, s), 9.77 (1H, s), 9.19 (1H, t, J = 5.8 Hz), 8.50 (1H, d, J = 4.1 Hz), 8.45 (1H, d, J = 5.0Hz), 8.06 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.88 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.82-7.70 (2H, m), 7.51-7.25 (7H, m), 7.10 (1H, d, J = 4.6 Hz), 6.98 (1H, dd, J = 8.8, 1.8 Hz), 6.96-6.91 (1H, m), 4.58 (2H, d, J = 5.9 Hz), 2.35 (3H, s). ESIMS m/z 461 (M + H)$^+$. Anal. Calcd. for $C_{28}H_{24}N_6O$ x 0.3 MTBE: C, 72.71; H, 5.77; N, 17.25. Found: C, 72.38; H, 5.80; N, 16.88.

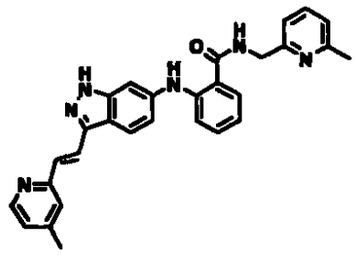
Example 38: 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino]-N-pyridin-4-ylmethyl-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Examples 6 and 7 above except using 2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and C-Pyridin-4-yl-methylamine.

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 12.90 (1H, s), 9.73 (1H, s), 9.21 (1H, t, J = 5.9 Hz), 8.49-8.44 (3H, m), 8.06 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.88 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.81 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.51-7.40 (4H, m), 7.31 (2H, d, J = 5.9 Hz), 7.24 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 4.4 Hz), 7.00 (1H, dd, J = 8.7, 1.7Hz), 6.97-6.92 (1H, m), 4.50 (2H, d, J = 5.9 Hz), 2.35 (3H, s). ESIMS m/z 461 (M + H)$^+$. Anal. Calcd. for $C_{28}H_{24}N_6O$ x 0.4 H_2O x 0.7 MTBE: C, 71.36; H, 6.45; N, 15.85. Found: C, 71.27; H, 6.29; N, 15.53.

Example 39: N-(6-Methyl-pyridin-2-ylmethyl)-2-{3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-benzamide

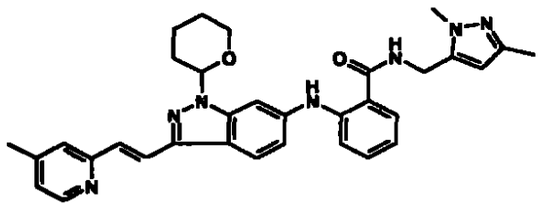


Prepared in a similar manner to that described for Examples 6 and 7 above except using 2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and C-(6-Methyl-pyridin-2-yl)-methylamine.

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ12.92 (1H, s), 9.76 (1H, s), 9.20 (1H, t, J = 5.8 Hz), 8.44 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.05 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.86 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.81 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.59 (1H, t, J = 7.7 Hz), 7.49-7.37 (4H, m), 7.23 (1H, s), 7.11-7.08 (3H, m), 6.99 (1H, dd, J = 8.7, 1.6 Hz), 6.95-6.90 (1H, m), 4.51 (2H, d, J = 5.9 Hz), 2.42 (3H, s), 2.33 (3H, s). ESIMS m/z 475 $(M + H)^+$. Anal. Calcd. for $C_{29}H_{26}N_6O$ x 0.4 DCM: C, 68.98; H, 5.29; N, 16.39. Found: C, 68.84; H, 5.42; N, 16.20.

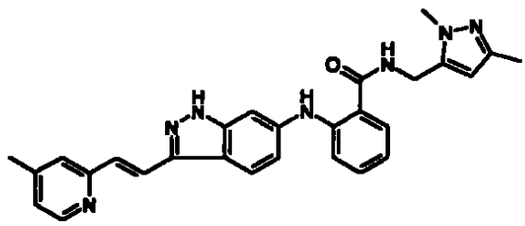
Example 40: *N*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-ylmethyl)-2-[(E)-3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide

Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using



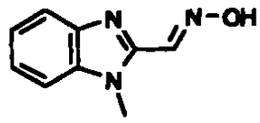
2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl-vinyl)-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and *C*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-yl)-methylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.81(1H, s), 9.05 (1H, bt), 8.46 8.7 Hz), 7.85 (1H, d, J=16.4 Hz), 7.71 (1H, d, J=7.5 Hz), 7.54-7.40 (5H, m), 7.11-7.09 (2H, m), 6.91 (1H, t, J = 6.9 Hz), 5.94 (1H, s), 5.80 (1H, d, J=7.3Hz), 4.45 (2H, d, J=5.5 Hz), 3.93-3.85 (1H, m), 3.78-3.69 (1H, m), 3.73 (3H, s), 2.45-2.35 (1H, m), 2.35 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.06-1.95 (2H, m), 1.85-1.53 (m, 3H).

Example 41: N-(2,5-Dimethyl-2H-pyrazol-3-ylmethyl)-2-{3-[(E)-2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 7 except using *N*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-ylmethyl)-2-[(E)-3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide instead of *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.90 (1H, s), 9.70 (1H, s), 9.03 (1H, t, J=6.0 Hz), 8.44 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.06 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.87 (1H, d, J=16.2 Hz), 7.70 (1H, d, J=7.5 Hz), 7.50-7.38 (4H, m), 7.22 (1H, s), 7.1 (1H, d, J = 5.6 Hz), 6.99 (1H, dd, J = 8.7, 1.5 Hz), 6.90 (1H, dt, J=7.9, 1.9 Hz), 5.91 (1H, s), 4.43 (2H, d, J=5.6Hz), 3.72 (3H, s), 2.34 (3H, s), 2.05 (3H, s).

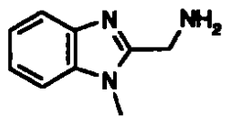
Example 42: 1-Methyl-1H-benzoimidazole-2-carbaldehyde oxime



To a stirred suspension of 1-Methyl-1H-benzoimidazole-2-carbaldehyde (980mg, 6.61mmol) in H_2O (10ml) was added a solution of Sodium Acetate (3.25g, 39.68mmol) and Hydroxylamine hydrochloride (1.38g, 19.84mmol) in 10ml of H_2O. The reaction was stirred at rt for 2hr and the thick precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under vacuum to give 1.02g (94%) of a white solid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.06 (1H, s), 8.28 (1H, s), 7.65 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.60 (1H, d, J = 6.8Hz), 7.32 (1H, t, J = 7.2 Hz); 7.23 (1H, t, J = 6.8 Hz), 4.00 (3H, s).

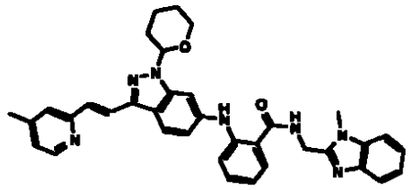
Anal. Calcd for $C_9H_9N_3O$: C, 61.70; H, 5.18; N, 23.99. Found: C, 61.80; H, 5.23; N, 23.98.

Example 43: C-(1-Methyl-1H-benzoimidazol-2-yl)-methylamine dihydrochloride



A Parr pressure bottle was charged with 1-Methyl-1H-benzoimidazole-2-carbaldehyde oxime M (267mg, 1.6mmol), 10% Palladium on Carbon (75mg), con HCl (2drops) and EtOH (25ml). The reaction mixture was shaken under 45psi H_2 for 2hr before the catalyst was removed by filtration. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was triturated with Et_2O to give 340mg (90%) of a white solid as the dihydrochloride salt and was used without further purification. ^{1}H NMR (DSMO-d_6): δ 8.87 (2H, broad s), 7.72 (2H, m), 7.38 (2H, m), 4.50 (2H, s), 3.89 (3H, s).

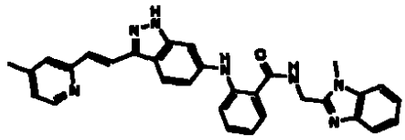
Example 44: N-(1-Methyl-1H-benzoimidazol-2-ylmethyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using C-(1-Methyl-1H-benzoimidazol-2-yl)-methylamine hydrochloride N and 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.82 (1H, s), 9.20 (1H, t, J = 5.3 Hz), 8.46 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.85 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.74 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.58 (1H, d, J = 7.2 Hz), 7.50 (6H, m), 7.19 (4H, m), 6.92 (1H, t, J = 8.1 Hz), 5.78 (1H, dd, J = 2.5, 9.5 Hz), 4.79 (2H, d, J = 5.5 Hz), 3.89 (1H,m), 3.83 (3H, s), 3.71 (1H, m), 2.41 (1H, m), 2.35 (3H, s), 2.00 (2H, m), 1.74 (1H, m), 1.57 (2H, m).

Anal. Calcd for $C_{36}H_{35}N_7O_2 \cdot 0.65$ Hexanes: C, 73.31; H, 6.80; N, 15.00. Found: C, 72.92; H, 6.90; N, 14.71.

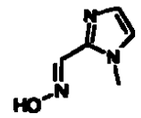
Example 45: N-(1-Methyl-1H-benzoimidazol-2-ylmethyl)-2-{3-[(E)2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino}-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 7 except that N-(1-Methyl-1H-benzoimidazol-2-ylmethyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide was used instead of of N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ12.93 (1H, s), 9.73 (1H, s), 9.19 (1H, t, J = 5.3 Hz), 8.45 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.06 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.88 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.74 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.60-7.36 (6H, m), 7.29-7.14 (3H, m), 7.10 (1H, d, J = 4.7 Hz), 7.04 (1H, dd, J = 1.8, 8.9 Hz), 6.91 (1H, t, J = 7.3 Hz), 4.79 (2H, d, J = 5.3 Hz), 3.83 (3H, s), 2.35 (3H, s).

Anal. Calcd for $C_{31}H_{27}N_7O \cdot 1.80H_2O \cdot 0.40CH_2Cl_2$: C, 65.02; H, 5.46; N, 16.91. Found: C, 64.97; H, 5.82; N, 17.09.

Example 46: 1-Methyl-1H-imidazole-2-carbaldehyde oxime

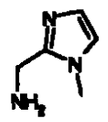


Prepared in a similar manner to that described for Example 39 except that 1-Methyl-1H-imidazole-2-carbaldehyde was used instead of 1-Methyl-1H-benzoimidazole-2-carbaldehyde.

^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ11.50 (1H, s), 8.05 (1H, s), 7.28 (1H, s), 6.95 (1H, s), 3.80 (3H, s).

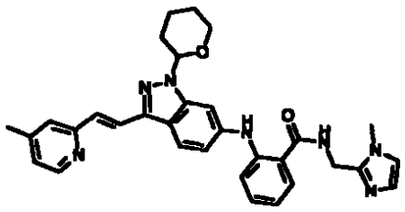
Anal. Calcd for $C_4H_7N_3O$: C, 47.99; H, 5.64; N, 33.58. Found: C, 48.22; H, 5.58; N, 33.45.

Example 47: C-(1-Methyl-1H-imidazol-2-yl)-methylamine dihydrochloride



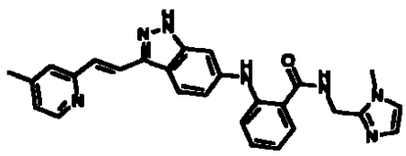
Prepared in a similar manner to that described for Example 40 except that 1-Methyl-1H-imidazole-2-carbaldehyde oxime was used instead of 1-Methyl-1H-benzoimidazole-2-carbaldehyde oxime. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 7.45 (1H, s), 7.29 (1H, s), 4.25 (21H, s), 3.79 (3H, s).

Example 48: N-(1-Methyl-1H-imidazol-2-ylmethyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



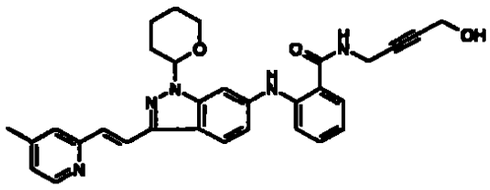
Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above except using C-(1-Methyl-1H-imidazol-2-yl)-methylamine hydrochloride and 2-[3-[2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.83 (1H, s, 9.03 (1H, t, J = 5.5 Hz), 8.45 (1H, d, J = 4.7 Hz), 8.09 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.85 (1H, d , J = 16.5 Hz), 8.67 (1H, d , J = 7.3 Hz), 7.53-7.39 (4H, m), 7.11 (3H, m), 6.90 (1H, d , J = 6.9 Hz), 6.86 (1H, s), 5.79 (1H, d , J = 8.9 Hz), 5.75 (1H, s), 4.54 (1H, d , J = 5.5 Hz), 3.85 - 3.70 (2H, m), 3.66 (3H, s), 2.35 (3H, s), 2.10 (2H, m), 1.70 (2H, m), 1.60 (3H, m). *Anal.* Calcd for $C_{32}H_{33}N_7O_2 \cdot 0.8\ CH_2Cl_2$: C, 63.99; H, 5.672; N, 15.93. Found: C, 63.95; H, 5.72; N, 16.01.

Example 49: N-(1-Methyl-1H-imidazol-2-ylmethyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



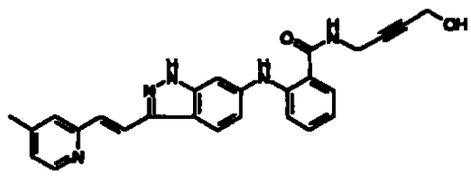
Prepared in a similar manner to that described for Example 7 except that N-(1-Methyl-1H-imidazol-2-ylmethyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide was used instead of of N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.89 (1H, s, 9.72 (1H, s, 8.99 (1H, t, J = 5.6 Hz), 8.44 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.05 (1H, d, J = 8.7 H), 7.86 (1H, d , J = 16.4 Hz), 7.68 (1H, d , J = 6.7 Hz), 7.49-7.36 (4H, m), 7.24 (1H, m), 7.09 (2H, d, J = 8.1Hz), 7.02 (1H, d, J = 8.8 Hz), 6.88 (1H, t, J = 6.9 Hz), 6.81 (1H, s), 4.52 (2H, d , J = 5.5 Hz), 3.29 (3H, s), 2.34 (3H, s). *Anal.* Calcd for $C_{27}H_{23}N_7O \cdot 0.35CH_2Cl_2$: C, 66.59; H, 5.25; N, 19.88. Found: C, 66.48; H, 5.65; N, 19.56.

Example 50: *N*-(4-Hydroxy-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide



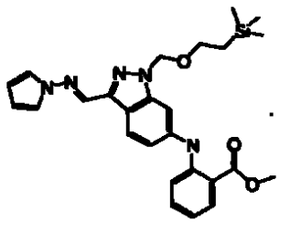
Prepared in a similar manner to that described for Example 6 except using 2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and 4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynylamine. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9.48 (H, s), 8.46 (1H, d, J = 5.3 Hz), 7.92 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.83 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.52 (1H, d, J = 16.6 Hz), 7.46-7.41 (2H, m), 7.34-7.31 (3H, m), 7.12 (1H, dd, J = 8.7, 1.9 Hz), 6.99 (1H, d, J = 4.9 Hz), 6.81 (1H, t, J = 6.8 Hz), 6.40 (1H, t, J = 4.9 Hz), 5.62 (1H, dd, J = 9.4, 3.0 Hz), 4.28-4.23 (4H, m), 4.08-4.01 (1H, m), 3.76-3.67 (1H, m), 2.63-2.49 (1H, m), 2.38 (3H, s), 2.22-2.06 (2H, m), 1.80-1.60 (3H, m).

Example 51: 2-[3-[(E)-2-(4-Methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1H-indazol-6-ylamino]-N-(4-hydroxy-but-2-ynyl)-benzamide



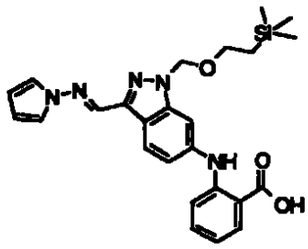
Prepared in a similar manner to that described for Example 7 except using a mixture of *N*-(4-Hydroxy-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide and *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4-methyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide instead of *N*-[4-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl)-2-[3-[2-(4,6-dimethyl-pyridin-2-yl)-vinyl]-1-(tetrahydro-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 12.92 (1H, s), 9.83 (1H, s), 9.00 (1H, t, J = 5.3 Hz), 8.44 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.06 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.87 (1H, d, J = 16.6 Hz), 7.68 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.50-7.38 (4H, m), 7.26 (1H, s), 7.09 (1H, d, J = 5.3 Hz), 7.01 (1H, dd, J = 8.7, 1.5 Hz), 6.88 (1H,dt, J = 6.8, 1.5 Hz), 5.11 (1H, t, J = 3.0 Hz), 4.10-4.04 (4H, m), 2.34 (3H, s).

Example 52: 2-[3-(Pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid methyl ester



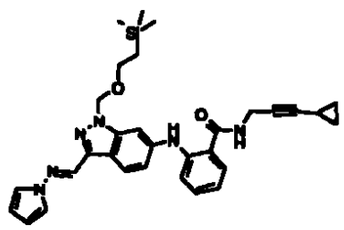
Prepared in a similar manner to that described for Examples 2 and 3 above except starting with 6-Nitro-3-styryl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazole instead of 6-Iodo-3-styryl-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazole.
This material was taken on as a crude mixture of poduct and 2-Amino-benzoic acid methyl ester in the next step.

Example 53: 2-[3-(Pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid



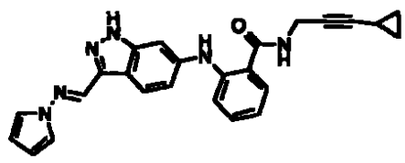
Isolated as a byproduct from reaction of N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide and TBAF using a procedure similar to Example 11 in US Serial Number 09/609,335, filed June 30, 2000, hereby incorporatd in its entirety for all purposes. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 13.19 (1H, broad s, 10.00 (1H, s, 9.13 (1H, s), 8.37 (1H, d, J = 8.7 Hz), 8.06 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.75 (1H, s), 7.64 (2H, t, J = 2.3 Hz), 7.54 (2H, m), 7.35 (1H, dd, J = 1.9, 8.7 Hz), 6.99 (1H, m), 6.33 (2H, t, J = 2.3 Hz), 5.89 (2H, s), 3.68 (2H, t, J = 8.1 Hz), 0.94 (2H, t , J = 8.1 Hz), 0.00 (9H, s).

Example 54: N-(3-Cyclopropyl-prop-2-ynyl)-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-[3-(Pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and 3-Cyclopropyl-prop-2-ynylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9.93 (1H, s), 8.99 (1H,s), 8.95 (1H, d, J = 5.6 Hz), 8.20 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.68 (1H, d , J = 8.1 Hz), 7.51 (4H, m), 7.37 (1H, t , J = 6.8 Hz), 7.14 (1H, d, J = 9.0 Hz), 6.91 (1H, t, J = 7.5 Hz), 6.21 (2H, t, J = 2.3 Hz), 5.74 (2H, s), 4.00 (2H, dd, J = 2.0, 5.6 Hz), 3.55 (2H, t, J = 7.9 Hz), 1.26 (1H, m), 0.82 (2H, t, J = 7.9 Hz), 0.72 (2H, m) 0.54 (2H, m), -0.12 (9H, s).

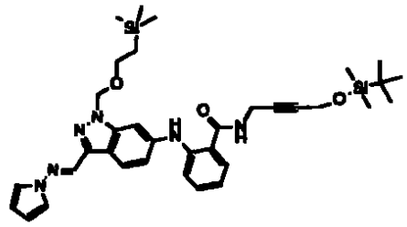
Example 55: N-(3-Cyclopropyl-prop-2-ynyl)-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 11 in US Patent Application Serial Number 09/609,335, filed June 30, 2000, herein incorporated by reference in its entirety for all purposes, except that N-(3-Cyclopropyl-prop-2-ynyl)-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide was used instead of N-methyl-N-(3-styryl-1-(2-trimethyl-silanyl)-ethoxymethyl]-1H-indazol-6-yl)-benzene-1,3-diamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 13.29 (1H, s), 9.83 (1H, s), 8.98 (1H, s), 8.95 (1H, t, J = 5.5 Hz), 8.19 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.68 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.52 (2H, t, J = 2.3 Hz), 7.43 (2H, m), 7.29 (1H, s), 7.07 (1H, dd, J = 1.9, 8.7 Hz), 6.91 (1H, t, J = 7.4 Hz), 6.21 (2H, t, J = 2.3 Hz), 4.01 (2H, dd, J = 1.7, 5.5 Hz), 1.27 (1H, m),

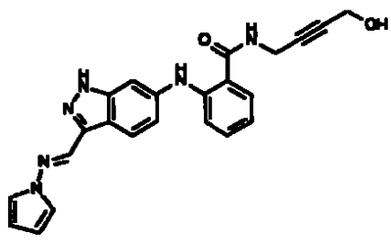
0.73 (2H, m), 0.55 (2H, m). *Anal.* Calcd for $C_{25}H_{22}N_6O \cdot 0.05$Hexanes $\cdot$ 0.30 H_2O: C, 70.31; H, 5.43; N, 19.45. Found: C, 70.63; H, 5.38; N, 19.18.

Example 56: N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above except using 2-[3-(Pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and 4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 10.04 (1H, s), 9.16 (1H, t, J = 5.3 Hz), 9.10 (1H,s), 8.31 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.78 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.67 (4H, m), 7.49 (1H, t , J = 8.5 Hz), 7.24 (1H, dd, J = 1.7, 8.7 Hz), 7.03 (1H, t, J = 7.4 Hz), 6.33 (2H, t, J = 2.3 Hz), 5.85 (2H, s), 4.83 (2H, s), 4.19 (2H, d, J = 5.5 Hz), 3.66 (2H, t, J = 7.9 Hz), 0.94 (2H, m), 0.89 (9H, s), 0.13 (6H, s), 0.00 (9H, s).

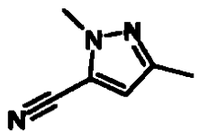
Example 57: N-(4-Hydroxy-but-2-ynyl)-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 11, In US Patent Application Serial Number 09/609,335, filed June 30, 2000, herein incorporated by reference in its entirety for all purposes, except that N-[4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-but-2-ynyl]-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide was used instead of N-methyl-N-[3-styryl-1-[2-trimethyl-silanyl)-ethoxymethyl]-1H-indazol-6-yl]-benzene-1,3-diamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 13.30 (1H,

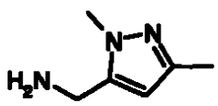
s), 9.87 (1H, s), 9.04 (1H, t, J = 5.3 Hz), 8.99 (1H, s), 8.19 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.70 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.46 (4H, m), 7.31 (1H, s), 7.08 (1H, dd, J = 1.7, 8.7 Hz), 6.91 (1H, t, J = 7.3 Hz), 6.21 (2H, t, J = 2.1 Hz), 5.14 (1H, t, J = 5.8 Hz), 4.10 (2H, d, J = 5.5 Hz), 4.06 (2H, d, J = 5.8 Hz). *Anal.* Calcd for $C_{22}H_{20}N_6O_2 \cdot 0.35$Hexanes $\cdot 0.20\ H_2O$: C, 67.45; H, 5.86; N, 18.81. Found: C, 67.70; H, 5.73; N, 18.56.

Example 58: 2,5-Dimethyl-2H-pyrazole-3-carbonitrile



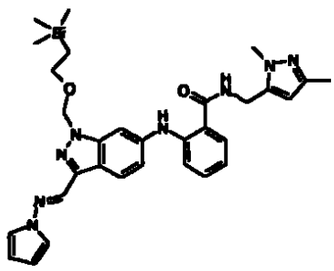
2,5-Dimethyl-2H-pyrazole-3-carbonitrile was prepared from ethyl 1,3-dimethylpyrazole-5-carboxdate according to procedures published for 1-methyl-pyrazol-5-carbonitrile by Castellanos, Maria and Montserrat, Llinas; JCS Perkins Trans I (1985) 1209-1215. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.52 (1H, s), 3.96 (3H, s), 2.27 (3H, s).

Example 59: *C*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-yl)-methylamine



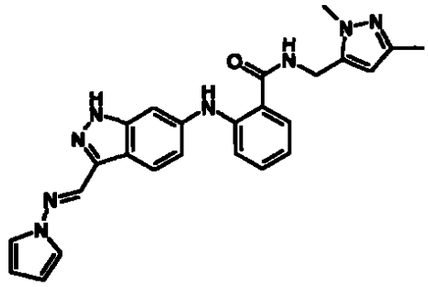
A suspension of 2,5-Dimethyl-2H-pyrazole-3-carbonitrile (654 mg, 5.4 mmol) and 10% palladium on carbon (200 mg) in ethanol (15 mL) was shaken in a Parr hydrogenation apparatus under 45 psi H_2 for 17 hr. The mixture was filtered through celite and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 608 mg of an oil which was used without any further purification. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 5.91 (1H, s), 3.81, 3.73 (2H,2s), 3.75 (3H, s), 2.21 (3H, s).

Example 60: *N*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-ylmethyl)-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



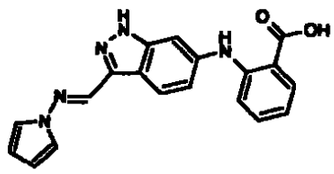
Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above except using 2-[3-(Pyrrol-1-yliminomethyl)- 1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and *C*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-yl)-methylamine. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 9.56 (1H, s), 8.68 (1H, s), 8.30 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.49 (1H, d, J=8.3 Hz), 7.43 (1H, dd, J = 7.9, 1.5 Hz), 7.36-7.31 (2H, m), 7.23 (2H, t, J=2.6 Hz), 7.17 (1H, dd, J = 8.7, 1.9 Hz), 6.83 (1H, t, J=7.2 Hz), 6.32 (1H, bt), 6.29 (2H, t, J=2.3 Hz), 6.01 (1H, s), 5.67 (2H, s), 4.61 (2H, d, J=5.6 Hz), 3.60 (3H, s), 3.58 (2H, t, J=8.3 Hz), 2.22 (3H, s), 0.90 (2H, t, J=8.7 Hz), 0.06 (9H, s).

Example 61: *N*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-ylmethyl)-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide



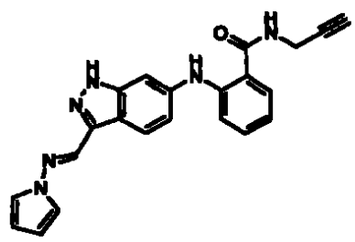
Prepared in a similar manner to that described for Example 11 in US Patent Application Serial Number 09/609,335, filed June 30, 2000, herein incorporated by reference in its entirety for all purposes, except that *N*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-ylmethyl)-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide was used instead of N-methyl-N-(3-styryl-1-[2-trimethyl-silanyl)-ethoxymethyl]-1H-indazol-6-yl)-benzene-1,3-diamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 13.27 (1H, s), 9.72 (1H, s), 9.05 (1H, t, J= 5.3 Hz), 8.97 (1H, s), 8.16 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.68 (1H, dd, J=8.3, 1.9 Hz), 7.50 (2H, t, J=2.8 Hz), 7.46-7.38 (2H, m), 7.25 (1H, s), 7.05 (1H, dd, J = 8.7, 1.9 Hz), 6.91 (1H, t, J=6.80 Hz), 6.20 (2H, t, J=2.3 Hz), 5.91 (1H, s), 4.43 (2H, d, J=5.6 Hz), 3.71 (3H, s), 2.04 (3H, s).

Example 62: 2-[3-(Pyrrol-1-yliminomethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid



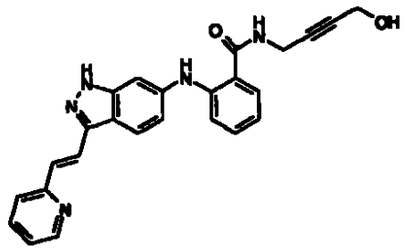
Prepared in a similar manner to that described for Example 11 in US Patent Application Serial Number 09/609,335, filed June 30, 2000, herein incorporated by reference in its entirety for all purposes, except using 2-[3-(Pyrrol-1-yliminomethyl)-1-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid instead of N-methyl-N-[3-styryl-1-[2-trimethyl-silanyl)-ethoxymethyl]-1H-indazol-6-yl]-benzene-1,3-diamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 13.12 (1H, s), 12.70 (1H, s), 8.94 (1H, s), 8.10 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.91 (1H, dd, J = 1.7, 7.7 Hz), 7.50 (2H, t, J = 2.3 Hz), 7.36 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.27 (1H, d, J = 1.5 Hz), 7.18 (1H, t, J = 7.5 Hz), 6.94 (1H, dd, J = 1.7, 8.7 Hz), 6.68 (1H, t, J = 7.5 Hz), 6.19(2H, t, J = 2.3 Hz).

Example 63: N-Prop-2-ynyl-2-[3-(pyrrol-1-yliminomethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamide



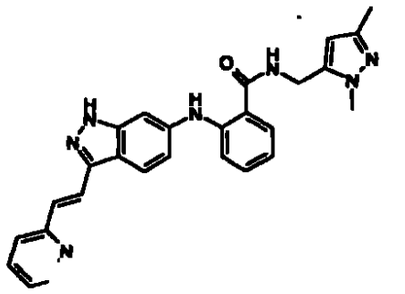
Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using 2-[3-(Pyrrol-1-yliminomethyl)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoic acid and propargylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 13.30 (1H, s), 9.82 (1H, s), 9.04 (1H, t, J = 5.6 Hz), 8.98 (1H, s), 8.19 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.69 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.45(4H, m), 7.31 (1H, s), 7.08 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.91 (1H, t, J = 7.6 Hz), 6.21 (2H, s), 4.05 (2H, s), 3.13 (1H, s). *Anal.* Calcd for $C_{22}H_{16}N_6O \cdot 0.40H_2O \cdot 0.05$ Hexanes: C, 67.97; H, 5.01; N, 21.33. Found: C, 67.91; H, 4.78; N, 21.00.

Example 64: *N*-(4-Hydroxy-but-2-ynyl)-2-[3-(2-pyridin-2-yl-vinyl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using tetrabutyl ammonimum 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoate and 4-Amino-but-2-yn-1-ol. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 12.95 (1H, s), 9.84 (1H, s), 9.02 (1H, t, J = 5.6 Hz), 8.59 (1H, d, J = 4.9 Hz), 8.08 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.90 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.80 (1H, t, J = 7.2 Hz), 7.70-7.64 (2H, m), 7.51 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.45-7.36 (2H, m), 7.27-7.24 (2H, m), 7.02 (1H, d, J = 9.0 Hz), 6.88 (1H, t, J = 7.2 Hz), 5.13 (1H, t, J = 5.6 Hz), 4.10-4.04 (4H, m).

Example 65: *N*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-ylmethyl)-2-[3-(2-pyridin-2-yl-vinyl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzamide



Prepared in a similar manner to that described for Example 6 above, except using tetrabutyl ammonimum 2-[3-(2-Pyridin-2-yl-vinyl)-1*H*-indazol-6-ylamino]-benzoate and *C*-(2,5-Dimethyl-2*H*-pyrazol-3-yl)-methylamine. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.93 (1H, s), 9.70 (1H, s), 9.04 (1H,bt), 8.58 (1H, d, J = 4.0 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.88 (1H, d, J=16.4 Hz), 7.79 (1H, t, J=8.6 Hz), 7.71-7.64 (2H, m), 7.50 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.44-7.39 (2H, m), 7.28-7.23 (2H, m), 7.00 (1H, d, J = 8.8 Hz), 6.90 (1H, t, J=8.0 Hz), 5.91 (1H, s), 4.43 (2H, d, J=5.5 Hz), 3.71 (3H, s), 2.04 (3H, s).

The exemplary compounds described above may be tested for their activity using the tests described below.

BIOLOGICAL TESTING: ENZYME ASSAYS

The stimulation of cell proliferation by growth factors such as VEFG, FGF, and others is dependent upon their induction of autophosphorylation of each of their respective receptor's tyrosine kinases. Therefore, the ability of a protein kinase inhibitor to block autophosphorylation can be measured by inhibition of the peptide substrates. To measure the protein kinase inhibition activity of the compounds, the following constructs were devised.

VEGF-R2 Construct for Assay: This construct determines the ability of a test compound to inhibit tyrosine kinase activity. A construct (VEGF-R2Δ50) of the cytosolic domain of human vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF-R2) lacking the 50 central residues of the 68 residues of the kinase insert domain was expressed in a baculovirus/insect cell system. Of the 1356 residues of full-length VEGF-R2, VEGF-R2Δ50 contains residues 806-939 and 990-1171, and also one point mutation (E990V) within the kinase insert domain relative to wild-type VEGF-R2. Autophosphorylation of the purified construct was performed by incubation of the enzyme at a concentration of 4 μM in the presence of 3 mM ATP and 40 mM $MgCl_2$ in 100 mM HEPES, pH 7.5, containing 5% glycerol and 5 mM DTT, at 4 °C for 2 h. After autophosphorylation, this construct has been shown to possess catalytic activity essentially equivalent to the wild-type autophosphorylated kinase domain construct. See Parast et al., *Biochemistry*, 37, 16788-16801 (1998).

FGF-R1 Construct for Assay: The intracellular kinase domain of human FGF-R1 was expressed using the baculovirus vector expression system starting from the endogenous methionine residue 456 to glutamate 766, according to the residue numbering system of Mohammadi et al., *Mol. Cell. Biol.*, 16, 977-989 (1996). In addition, the construct also has the following 3 amino acid substitutions: L457V, C488A, and C584S.

LCK Construct for Assay: The LCK tyrosine kinase was expressed in insect cells as an N-terminal deletion starting from amino acid residue 223 to the end of the protein at residue 509, with the following two amino acid substitutions at the N-terminus: P233M and C224D.

CHK1 Construct for Assay: C-terminally His-tagged full-length human CHK1 (FL-CHK1) was expressed using the baculovirus/insect cell system. It contains 6 histidine residues (6 x His-tag) at the C-terminus of the 476 amino acid human CHK1. The protein was purified by conventional chromatographic techniques.

CDK2/Cyclin A Construct for Assay: CDK2 was purified using published methodology (Rosenblatt et al., *J. Mol. Biol.*, 230, 1317-1319 (1993)) from insect cells that had been infected with a baculovirus expression vector. Cyclin A was purified from *E. coli* cells expressing full-length recombinant cyclin A, and a truncated cyclin A construct was generated by limited proteolysis and purified as described previously (Jeffrey et al., *Nature*, 376, 313-320 (1995)).

CDK4/Cyclin D Construct for Assay: A complex of human CDK4 and cyclin D3, or a complex of cyclin D1 and a fusion protein of human CDK4 and glutathione-S-transferase (GST-CDK4), was purified using traditional biochemical chromatographic techniques from insect cells that had been co-infected with the corresponding baculovirus expression vectors.

FAK Construct for Assay. The catalytic domain of human FAK (FAKcd409) was expressed using the baculovirus vector expression system. The 280 amino acid domain expressed comprises residues methionine 409 to glutamate 689. One amino acid substitution exists (P410T) relative to the sequence assession number L13616 published by Whitney, G.S. *et al., DNA Cell Biol,* 9, 823-30 (1993). The protein was purified using classical chromatography techniques.

TIE-2 (TEK) Construct for Assay

The TIE-2 tyrosine kinase domain was expressed in insect cells as an N-terminal deletion starting from amino acid residue 774 to the end of the protein at residue 1124. This construct also carries a R774M mutation, which serves as the initiating methionine residue in translation.

VEGF-R2 Assay

Coupled Spectrophotometric (FLVK-P) Assay

The production of ADP from ATP that accompanies phosphoryl transfer was coupled to oxidation of NADH using phosphoenolpyruvate (PEP) and a system having pyruvate kinase (PK) and lactic dehydrogenase (LDH). The oxidation of NADH was monitored by following the decrease of absorbance at 340 nm (e_{340} = 6.22 cm^{-1} mM^{-1}) using a Beckman DU 650 spectrophotometer. Assay conditions for phosphorylated VEGF-R2Δ50 (indicated as FLVK-P in the tables below) were the following: 1 mM PEP; 250 µM NADH; 50 units of LDH/mL; 20 units of PK/mL; 5 mM DTT; 5.1 mM poly(E_4Y_1); 1 mM ATP; and 25 mM $MgCl_2$ in 200 mM HEPES, pH 7.5. Assay conditions for unphosphorylated VEGF-R2Δ50 (indicated as FLVK in the tables) were the following: 1 mM PEP; 250 µM NADH; 50 units of LDH/mL; 20 units of PK/mL; 5 mM DTT; 20 mM poly(E_4Y_1); 3 mM ATP; and 60 mM $MgCl_2$ and 2 mM $MnCl_2$ in 200 mM HEPES, pH 7.5. Assays were initiated with 5 to 40 nM of enzyme. K_i values were determined by measuring enzyme activity in the presence of varying concentrations of test compounds. The data were analyzed using Enzyme Kinetic and Kaleidagraph software.

ELISA Assay

Formation of phosphogastrin was monitored using biotinylated gastrin peptide (1-17) as substrate. Biotinylated phosphogastrin was immobilized using streptavidin coated 96-well microtiter plates followed by detection using anti-phosphotyrosine-antibody conjugated to horseradish peroxidase. The activity of horseradish peroxidase was monitored using 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzathiazoline sulfonate(6)] diammonium salt (ABTS). Typical assay solutions contained: 2 µM biotinylated gastrin peptide; 5 mM DTT; 20 µM ATP; 26 mM $MgCl_2$;

and 2 mM $MnCl_2$ in 200 mM HEPES, pH 7.5. The assay was initiated with 0.8 nM of phosphorylated VEGF-R2Δ50. Horseradish peroxidase activity was assayed using ABTS, 10 mM. The horseradish peroxidase reaction was quenched by addition of acid (H_2SO_4), followed by absorbance reading at 405 nm. K_i values were determined by measuring enzyme activity in the presence of varying concentrations of test compounds. The data were analyzed using Enzyme Kinetic and Kaleidagraph software.

FGF-R Assay

The spectrophotometric assay was carried out as described above for VEGF-R2, except for the following changes in concentration: FGF-R = 50 nM, ATP = 2 mM, and poly(E4Y1) = 15 mM.

LCK Assay

The spectrophotometric assay was carried out as described above for VEGF-R2, except for the following changes in concentration: LCK = 60 nM, $MgCl_2$ = 0 mM, poly(E4Y1) = 20 mM.

CHK1 Assay

The production of ADP from ATP that accompanies phosphoryl transfer to the synthetic substrate peptide Syntide-2 (PLARTLSVAGLPGKK) was coupled to oxidation of NADH using phosphoenolpyruvate (PEP) through the actions of pyruvate kinase (PK) and lactic dehydrogenase (LDH). The oxidation of NADH was monitored by following the decrease of absorbance at 340 nm (ϵ340 = 6.22 cm^{-1} mM^{-1}) using a HP8452 spectrophotometer. Typical reaction solutions contained: 4 mN PEP; 0.15 mM NADH; 28 units of LDH/mL; 16 units of PK/mL; 3 mM DTT; 0.125 mM Syntide-2; 0.15 mM ATP; 25 mM $MgCl_2$ in 50 mM TRIS, pH 7.5; and 400 mM NaCl. Assays were initiated with 10 nM of FL-CHK1. K_i values were determined by measuring initial enzyme activity in the presence of varying concentrations of test compounds. The data were analyzed using Enzyme Kinetic and Kaleidagraph software.

CDK2/Cyclin A and CDK4/Cyclin D Assays

Cyclin-dependent kinase activity was measured by quantifying the enzyme-catalyzed, time-dependent incorporation of radioactive phosphate from [^{32}P]ATP into a recombinant fragment of the retinoblastoma protein. Unless noted otherwise, assays were performed in 96-well plates in a total volume of 50 µL, in the presence of 10 mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, 25 µM adenosine triphosphate (ATP), 1 mg/mL ovalbumin, 5 µg/mL leupeptin, 1 mM dithiothreitol, 10 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM sodium vanadate, 1 mM sodium fluoride, 2.5 mM ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N'N'-tetraacetic acid (EGTA), 2% (v/v) dimethylsulfoxide, and 0.03 - 0.2 µCi [^{32}P]ATP. The substrate (0.3-0.5 µg) was purified recombinant retinoblastoma

protein fragment (Rb) (residues 386-928 of the native retinoblastoma protein; 62.3 kDa, containing the majority of the phosphorylation sites found in the native 106-kDa protein, as well as a tag of six histidine residues for ease of purification). Reactions were initiated with CDK2 (150 nM CDK2/Cyclin A complex) or CDK4 (50 nM CDK4/Cyclin D3 complex), incubated at 30 °C, and terminated after 20 minutes (min.) by the addition of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to 250 mM. The phosphorylated substrate was then captured on a nitrocellulose membrane using a 96-well filtration manifold, and unincorporated radioactivity was removed by repeated washing with 0.85% phosphoric acid. Radioactivity was quantified by exposing the dried nitrocellulose membranes to a phosphorimager. Apparent K_i values were measured by assaying enzyme activity in the presence of different compound concentrations and subtracting the background radioactivity measured in the absence of enzyme. The kinetic parameters (kcat, Km for ATP) were measured for each enzyme under the usual assay conditions by determining the dependence of initial rates on ATP concentration. The data were fit to an equation for competitive inhibition using Kaleidagraph (Synergy Software), or were fit to an equation for competitive tight-binding inhibition using the software KineTic (BioKin, Ltd.). Measured K_i values for known inhibitors against CDK4 and CDK2 agreed with published IC_{50} values. The specific activity of CDK4 was the same whether complexed to full-length cyclin D3 or the truncated Cyclin D3 construct; both complexes also yielded very similar K_i values for selected inhibitors.

FAK Assay

FAK HTS utilized the fluorescence polarization assay provided by LJL Biosystems. The kinase reaction contained: 100mM Hepes pH 7.5, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 1mM ATP, and 1mg/ml poly Glu-Tyr (4:1). The reaction is initiated by the addition of 5nM FAKcd409. The reaction is terminated by the addition of EDTA followed by addition of fluor-labelled peptide and anti-phosphotyrosine antibody, both provided by LJL Biosystems. Inhibition results are read on a Analyst (LJL) detector.

Tie-2 Spectrophotometric Assay

The kinase-catalyzed production of ADP from ATP that accompanies phosphoryl transfer to the random copolymer poly(Glu_4Tyr) was coupled to the oxidation of NADH through the activities of pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH). NADH conversion to NAD^+ was monitored by the decrease in absorbance at 340 nm (ε = 6.22 $cm^{-1}mM^{-1}$) using a Beckman DU650 spectrophotometer. Typical reaction solutions contained 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.24 mM NADH, 40 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2.9 mg/mL poly(Glu_4Tyr), 0.5 mM ATP, 15 units/mL PK, 15 units/mL LDH in 100 mM HEPES, pH 7.5. Assays were initiated with the addition of 4 to 12 nM phosphorylated Tie-2 (aa 775-1122). Percent inhibition was determined in triplicate at a 1 μM level of inhibitor.

TIE-2 DELFIA Assay

Formation of phosphotyrosine was monitored using biotinylated p34cdc2 (aa6-20 = KVEKIGEGTYGVVYK) peptide as substrate. Biotinylated peptide was immobilized using NeutrAvidin™ coated 96-well microtiter plates followed by detection using anti-phosphotyrosine-antibody (PY20) conjugated to europium N1 chelate. Typical assay solutions contained: 1 µM biotinylated p34cdc2 peptide, 150 µM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.01% BSA, 5% glycerol, 2% DMSO, 25 mM HEPES pH 7.5. The assay was initiated in the NeutrAvidin plate with 50 nM of TIE2 intracellular domain. The kinase reaction was terminated with 50 mM EDTA. Plates were then washed, and europium antibody added. After incubation, they were again washed, and DELFIA™ Enhancement Solution added. Plates were read at standard Europium time-resolved settings (ex 340 nm, em 615 nm, delay 400 µsec, window 400 µsec). Percent inhibition was calculated with reference to intraplate wells which had added DMSO rather than compound in DMSO, with background subtracted from both experimental and control with reference to an intraplate well which had EDTA added prior to addition of enzyme.

HUVEC Proliferation Assay

This assay determines the ability of a test compound to inhibit the growth factor-stimulated proliferation of human umbilical vein endothelial cells ("HUVEC"). HUVEC cells (passage 3-4, Clonetics, Corp.) were thawed into EGM2 culture medium (Clonetics Corp) in T75 flasks. Fresh EGM2 medium was added to the flasks 24 hours later. Four or five days later, cells were exposed to another culture medium (F12K medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 60 µg/mL endothelial cell growth supplement (ECGS), and 0.1 mg/mL heparin). Exponentially-growing HUVEC cells were used in experiments thereafter. Ten to twelve thousand HUVEC cells were plated in 96-well dishes in 100 µl of rich, culture medium (described above). The cells were allowed to attach for 24 hours in this medium. The medium was then removed by aspiration and 105 µl of starvation media (F12K+1% FBS) was added to each well. After 24 hours, 15 µl of test agent dissolved in 1% DMSO in starvation medium or this vehicle alone was added into each treatment well; the final DMSO concentration was 0.1%. One hour later, 30 µl of VEGF (30 ng/mL) in starvation media was added to all wells except those containing untreated controls; the final VEGF concentration was 6 ng/mL. Cellular proliferation was quantified 72 hours later by MTT dye reduction, at which time cells were exposed for 4 hours MTT (Promega Corp.). Dye reduction was stopped by addition of a stop solution (Promega Corp.) and absorbance at 595 λ was determined on a 96-well spectrophotometer plate reader.

IC_{50} values were calculated by curve-fitting the response of A^{595} to various concentrations of the test agent; typically, seven concentrations separated by 0.5 log were

employed, with triplicate wells at each concentration. For screening compound library plates, one or two concentrations (one well per concentration) were employed, and the % inhibition was calculated by the following formula:

% Inhibition = (control – test) ÷ (control – starvation)

where

control = A^{595} when VEGF is present without test agent

test = A^{595} when VEGF is present with test agent

starvation = A^{595} when VEGF and test agent are both absent.

Mouse PK Assay

The pharmacokinetics (e.g., absorption and elimination) of drugs in mice were analyzed using the following experiment. Test compounds were formulated as a solution or suspension in a 30:70 (PEG 400: acidified H_2O) vehicle or as a suspension in 0.5% CMC. This was administered orally (p.o.) and intraperitoneally (i.p.) at variable doses to two distinct groups (*n*=4) of B6 female mice. Blood samples were collected via an orbital bleed at time points: 0 hour (pre-dose), 0.5 h, 1.0 h, 2.0 h, and 4.0 h, and 7.0 h post dose. Plasma was obtained from each sample by centrifugation at 2500 rpm for 5 min. Test compound was extracted from the plasma by an organic protein precipitation method. For each time bleed 50 µL of plasma was combined with 1.0 mL of acetonitrile, vortexed for 2 min. and then spun at 4000 rpm for 15 min. to precipitate the protein and extract out the test compound. Next, the acetonitrile supernatant (the extract containing test compound) was poured into new test tubes and evaporated on a hot plate (25°C) under a steam of N_2 gas. To each tube containing the dried test compound extract 125 µL of mobile phase (60:40, 0.025 M $NH_4H_2PO_4$ +2.5 mL/L TEA:acetonitrile) was added. The test compound was resuspended in the mobile phase by vortexing and more protein was removed by centrifugation at 4000 rpm for 5 min. Each sample was poured into an HPLC vial for test compound analysis on an Hewlett Packard 1100 series HPLC with UV detection. From each sample, 95 □L was injected onto a Phenomenex-Prodigy reverse phase C-18, 150 x 3.2 mm column and eluted with a 45-50% acetonitrile gradient run over 10 min. Test-compound plasma concentrations (µg/mL) were determined by a comparison to standard curve (peak area vs. conc. µg/mL) using known concentrations of test compound extracted from plasma samples in the manner described above. Along with the standards and unknowns, three groups (n=4) of quality controls (0.25 µg/mL, 1.5 µg/mL, and 7.5 µg/mL) were run to insure the consistency of the analysis. The standard curve had an R2> 0.99 and the quality controls were all within 10 % of their expected values. The quantitated test samples were plotted for visual display using Kalidagraph software and their pharmacokinetic parameters were determined using WIN NONLIN software. Example 1(a)

provided the following results: 0.69 (Mouse pK, AUC, ip, µg-h/ml); 0.33 (Mouse pK, AUC, po, µg-h/ml).

KDR (VEGFR2) phosphorylation in PAE-KDR cells assay

This assay determines the ability of a test compound to inhibit the autophosphorylation of KDR in porcine aorta endothelial (PAE)-KDR cells. PAE cells that overexpress human KDR were used in this assay. The cells were cultured in Ham's F12 media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 400ug/mL G418. Thirty thousands cells were seeded into each well of a 96-well plate in 75 µL of growth media and allowed to attach for 6 hours at 37°C. Cells were then exposed to the starvation media (Ham's F12 media supplemented with 0.1% FBS) for 16 hours. After the starvation period was over, 10 µL of test agent in 5% DMSO in starvation media were added to the test wells and 10 µL of the vehicle (5% DMSO in starvation media) were added into the control wells. The final DMSO concentration in each well was 0.5%. Plates were incubated at 37µC for 1 hour and the cells were then stimulated with 500 ng/ml VEGF (commercially available from R & D System) in the presence of 2mM Na_3VO_4 for 8 minutes. The cells were washed once with 1 mm Na_3VO_4 in HBSS and lysed by adding 50 µL per well of lysis buffer. One hundred µL of dilution buffer were then added to each well and the diluted cell lysate was transferred to a 96-well goat ant-rabbit coated plate (commercially available from Pierce) which was pre-coated with Rabbit anti Human Anti-flk-1 C-20 antibody (commercially available from Santa Cruz). The plates were incubated at room temperature for 2 hours and washed seven times with 1% Tween 20 in PBS. HRP-PY20 (commercially available from Santa Cruz) was diluted and added to the plate for a 30-minute incubation. Plates were then washed again and TMB peroxidase substrate (commercially available from Kirkegaard & Perry) was added for a 10-minute incubation. One hundred µL of 0.09 N H_2SO_4 was added to each well of the 96-well plates to stop the reaction. Phosphorylation status was assessed by spectrophotometer reading at 450 nm. IC_{50} values were calculated by curve fitting using a four-parameter analysis.

PAE-PDGFRß phosphorylation in PAE-PDGFRß cells assay

This assay determines the ability of a test compound to inhibit the autophosphorylation of PDGFRβ in porcine aorta endothelial (PAE)- PDGFRβ cells. PAE cells that overexpress human PDGFRβ were used in this assay. The cells were cultured in Ham's F12 media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 400ug/ml G418. Twenty thousands cells were seeded in each well of a 96-well plate in 50 µL of growth media and allowed to attach for 6 hours at 37°C. Cells were then exposed to the starvation media (Ham's F12 media supplemented with 0.1% FBS) for 16 hours. After the starvation period was over, 10 µL of test agent in 5% DMSO in starvation media were added to the test wells

and 10 µL of the vehicle (5% DMSO in starvation media) were added into the control wells. The final DMSO concentration in each well was 0.5%. Plates were incubated at 37°C for 1 hour and the cells were then stimulated with 1µg/mL PDGF-BB (R & D System) in the presence of 2mM Na_3VO_4 for 8 minutes. The cells were washed once with 1 mm Na_3VO_4 in HBSS and lysed by adding 50 µL per well of lysis buffer. One hundred µL of dilution buffer were then added to each well and the diluted cell lysate was transferred to a 96-well goat anti-rabbit coated plate (Pierce), which was pre-coated with Rabbit anti Human PDGFRβ antibody (Santa Cruz). The plates were incubated at room temperature for 2 hours and washed seven times with 1% Tween 20 in PBS. HRP-PY20 (Santa Cruz) was diluted and added to the plate for a 30-minute incubation. Plates were then washed again and TMB peroxidase substrate (Kirkegaard & Perry) was added for a 10-minute incubation. One hundred µL of 0.09 N H_2SO_4 was added into each well of the 96-well plate to stop the reaction. Phosphorylation status was assessed by spectrophotometer reading at 450 nm. IC_{50} values were calculated by curve fitting using a four-parameter analysis.

Human Liver Microsome (HLM) Assay

Compound metabolism in human liver microsomes was measured by LC-MS analytical assay procedures as follows. First, human liver microsomes (HLM) were thawed and diluted to 5 mg/mL with cold 100 mM potassium phosphate (KPO4) buffer. Appropriate amounts of KPO4 buffer, NADPH-regenerating solution (containing B-NADP, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and $MgCl_2$), and HLM were preincubated in 13 x 100 mm glass tubes at 37 C for 10 min. (3 tubes per test compound--triplicate). Test compound (5 □M final) was added to each tube to initiate reaction and was mixed by gentle vortexing, followed by incubation at 37 °C. At t=0, 2 h, a 250-µL sample was removed from each incubation tube to separate 12 x 75 mm glass tubes containing 1 mL ice-cold acetonitrile with 0.05 µM reserpine. Samples were centrifuged at 4000 rpm for 20 min. to precipitate proteins and salt (Beckman Allegra 6KR, S/N ALK98D06, #634). Supernatant was transferred to new 12 x 75 mm glass tubes and evaporated by Speed-Vac centrifugal vacuum evaporator. Samples were reconstituted in 200 µL 0.1% formic acid/acetonitrile (90/10) and vortexed vigorously to dissolve. The samples were then transferred to separate polypropylene microcentrifuge tubes and centrifuged at 14000 x g for 10 min. (Fisher Micro 14, S/N M0017580). For each replicate (#1-3) at each timepoint (0 and 2 h), an aliquot sample of each test compound was combined into a single HPLC vial insert (6 total samples) for LC-MS analysis, which is described below.

The combined compound samples were injected into the LC-MS system, composed of a Hewlett-Packard HP1100 diode array HPLC and a Micromass Quattro II triple quadruple mass spectrometer operating in positive electrospray SIR mode (programmed to scan

specifically for the molecular ion of each test compound. Each test compound peak was integrated at each timepoint. For each compound, peak area at each timepoint (n=3) was averaged, and this mean peak area at 2 h was divided by the average peak area at time 0 hour to obtain the percent test compound remaining at 2 h.

The results of the testing of the compounds using various assays are summarized in the table below, where a notation of "% @" indicates the percent inhibition at the stated concentration, "*" values represent Ki (nM) or % Inhibition at a compound concentration of 1 μM for * or 50 nM for **, unless otherwise indicated. "NT" indicates no significant inhibition or not tested.

TABLE 1

Example #	FLVK Ki % Inh @ 50 nM	FLVK-P**	LckP* %Inhibit @1μM	FGF-P %Inhibit @1μM	HUVEC IC50 (nM)	HUVEC + albumin IC50 (nM)	%remaining (HLM)	PAE PDGFR autophos IC50 (nM)	PAE KDR IC50 nM AVG	bFGF Huvec IC50 (nM) AVG
3(a)	98	NT	30	99	12.7	NT	NT	NT	NT	NT
3(b)	98	NT	27	96	5.7	NT	84@2h	NT	NT	NT
3(c)	91	NT	9	83	0.43	9.2	46@0.5h	NT	NT	NT
3(d)	89	NT	11	80	0.4	7.5	88@2h	3.5	NT	147
3(f)	95	NT	41	80	NT	> 100	NT	NT	NT	NT
3(g)	95	NT	28	72	1.1	NT	72@0.5h	NT	NT	NT
3(h)	98	NT	37	85	1.8	NT	75@0.5h	0.63	NT	NT
3(i)	88	NT	22	45	0.2	NT	NT	1.9	NT	1000
3(j)	80	NT	17	43	1.7	NT	85@0.5h	4.7	NT	NT
3(k)	74	NT	19	38	0.8	NT	75@0.5h	5	NT	1000
3(q)	47	NT	7	31	5	NT	82@0.5h	5.2	NT	NT
2(h)	84	NT	NT	75	1.6	NT	74@0.5h	2.8	NT	70
1(k)	27	NT	NT	12	>10	NT	NT	NT	NT	NT
2(g)	83	NT	NT	79	0.71	NT	85@0.5h	10.5	NT	173
34	94	NT	NT	39	0.15	NT	66@0.5h	5.5	NT	1250
35	3.11nM	NT	NT	NT	3.4	NT	86@0.5h	5.8	NT	NT
31	85	NT	NT	14	6.5	NT	NT	NT	NT	862
41	45	NT	NT	11	6.4	NT	NT	NT	NT	3775
51	82	NT	NT	52	NT	NT	NT	NT	NT	NT
15	84	NT	NT	29	1.5	NT	NT	12.3	NT	1613
36	95	0.3nM	NT	59	1.67	NT	NT	NT	1.62	935

TABLE 1 CONTINUED

Example #	FLVK KI % Inh @ 50 nM	FLVK-P***	LckP* %Inhibit @10M	FGF-P %Inhibit @10M	HUVEC IC50 (nM)	HUVEC + albumin IC50 (nM)	%remaining (HLM)	PAE PDGFR autophos IC50 (nM)	PAE KDR IC50 nM AVG	bFGF Huvec IC50 (nM) AVG
13	80	NT	NT	63	NT	NT	NT	6	NT	NT
18	94	NT	NT	59%	NT	NT	NT	NT	NT	1882
20	91	NT	NT	35%	0.084	NT	NT	NT	NT	NT
37	90	NT	NT	45	NT	NT	NT	NT	0.76	NT
38	75	NT	NT	NT	NT	0.68	NT	2	NT	NT
39	96	NT	NT	76%	NT	NT	NT	4.7	NT	NT
32	78	NT	NT	70%	0.61	NT	97@0.5h	0.5	NT	NT
55	97	NT	NT	67%	0.2	NT	NT	3.7	NT	NT
57	91	NT	NT	52%	<1.8	NT	NT	1.3	NT	NT
83	85	NT	NT	83%	0.1	NT	NT	2.4	NT	NT
34	72	NT	NT	NT	NT	NT	NT	4.5	NT	NT
10	76	8.07	NT	38, 197nM	0.67	NT	80@0.5h	21	NT	NT
45	28	NT	NT	24	NT	NT	NT	NT	NT	NT
49	11	NT	NT	36	NT	NT	NT	NT	NT	NT
23	23	NT	NT	56	NT	NT	NT	40	NT	NT
25	84	NT	NT	13	3	NT	NT	NT	NT	NT

In Vivo Assay of Retinal Vascular Development in Neonatal Rats

The development of the retinal vascular in rats occurs from postnatal day 1 to postnatal day 14 (P1-P14). This process is dependent on the activity of VEGF (J. Stone, et al, *J. Neurosci.*, 15, 4738 (1995)). Previous work has demonstrated that VEGF also acts as a survival factor for the vessels of the retina during early vascular development (Alon, et. al, *Nat. Med.*, 1, 1024 (1995)). To assess the ability of specific compounds to inhibit the activity of VEGF *in vivo*, compounds were formulated in an appropriate vehicle, usually 50% polyethylene glycol, average molecular weight 400 daltons, and 50% solution of 300 mM sucrose in deionized water. Typically, two microliters (2 □l) of the drug solution was injected into the midvitreous of the eye of rat pups on postnatal day 8 or 9. Six days after the intravitreal injection, the animals were sacrificed and the retinas dissected free from the remaining ocular tissue. The isolated retinas were then subjected to a

histochemical staining protocol that stains endothelial cells specifically (Lutty and McLeod, *Arch. Ophthalmol.*, 110, 267 (1992)), revealing the extent of vascularization within the tissue sample. The individual retinas are then flat-mount onto glass slides and examined to determine the extent of vascularization. Effective compounds inhibit the further development of the retinal vasculature and induce a regression of all but the largest vessels within the retina. The amount of vessel regression was used to assess the relative potency of the compounds after in vivo administration. Vessel regression is graded on subjective scale of one to three pluses, with one plus being detectable regression judged to be approximately 25 percent or less, two pluses being judged to be approximataly 25-75% regression and three pluses give to retinas with near total regression (approximately 75% or greater).

For more quantitative analysis of regression, images of ADPase-stained, flat-mounted retinas were captured with a digital camera attached to a dissecting microscope. Retinal images were then imported into an image analysis software (Image Pro Plus 4.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). The software was employed to determine the percentage of the area of the retina that contained stained vessels. This value for the experimental eye was compared to that measured for the vehicle injected, contralateral eye from the same animal. The reduction in the vascular area seen in the eye that received compound as compared to the vehicle-injected eye was then expressed as the "percent regression" for that sample. Percent regression values were averaged for groups of 5-8 animals.

In samples in which observation through the microscope indicated near total regression, a percent regression value of 65-70% was routinely measured. This was due to stain deposits within folds of retina, folds that were induced by the vehicle used for drug injection. The image analysis software interpreted these stain-containing folds as vessels. No attempt was made to correct for these folds since they varied from eye to eye. Thus, it should be noted that the percent regression values reported result from a conservative measurement that accurately rank orders compounds, but underestimates their absolute potency.

<u>In Vivo Assay of Retinal Vascular Development in Neonatal Rat Model of Retinopathy of Prematurity</u>

A second model of VEGF dependent retinal neovascularization was employed to evaluate the activities of this series of compounds. In this model (Penn et. al, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36, 2063, (1995)), rats pups (n=16) with their mother are placed in a computer controlled chamber that regulates the concentration of oxygen. The animals are exposed for 24 hours to a concentration of 50% oxygen followed by 24 hours at a concentration of 10% oxygen. This alternating cycle of hyperoxia followed by hypoxia is

repeated 7 times after which the animals are removed to room air (P14). Compounds are administered via intravitreal injection upon removal to room air and the animals are sacrificed 6 days later (P20). The isolated retinas are then isolated, stained mounted and analyzed as detail above in the development model. The effectiveness was also graded as is described for the development model.

The exemplary compounds described above may be formulated into pharmaceutical compositions according to the following general examples.

Example 1: Parenteral Composition

To prepare a parenteral pharmaceutical composition suitable for administration by injection, 100 mg of a water-soluble salt of a compound of Formula I is dissolved in DMSO and then mixed with 10 mL of 0.9% sterile saline. The mixture is incorporated into a dosage unit form suitable for administration by injection.

Example 2: Oral Composition

To prepare a pharmaceutical composition for oral delivery, 100 mg of a compound of Formula I is mixed with 750 mg of lactose. The mixture is incorporated into an oral dosage unit for, such as a hard gelatin capsule, which is suitable for oral administration.

Example 3: Intraocular Composition

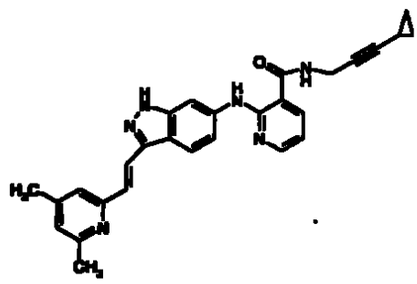
To prepare a sustained-release pharmaceutical composition for intraocular delivery, a compound of Formula I is suspended in a neutral, isotonic solution of hyaluronic acid (1.5% conc.) in phosphate buffer (pH 7.4) to form a 1% suspension.

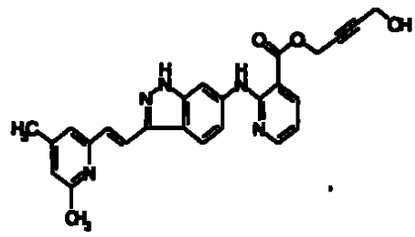
It is to be understood that the foregoing description is exemplary and explanatory in nature, and is intended to illustrate the invention and its preferred embodiments. Through routine experimentation, the artisan will recognize apparent modifications and variations that may be made without departing from the spirit of the invention. Thus, the invention is intended to be defined not by the above description, but by the following claims and their equivalents.

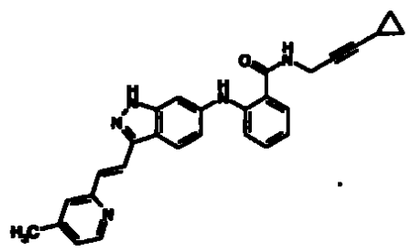
CLAIMS

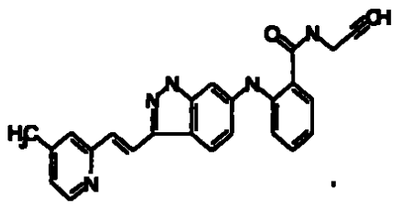
What is claimed is:

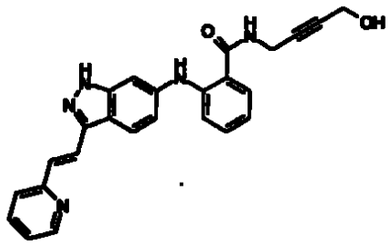
1. A compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt, selected from the group consisting of:

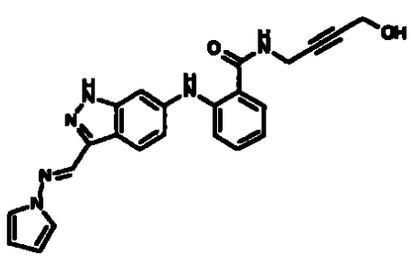


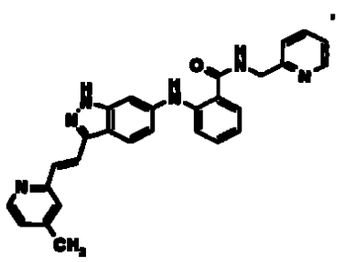


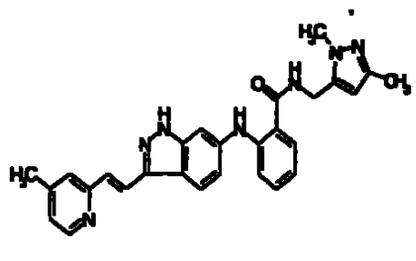


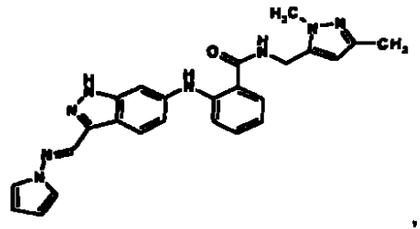


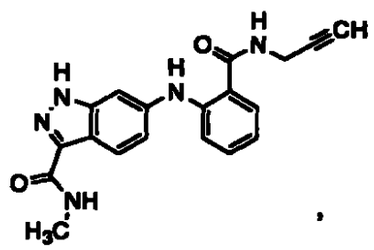


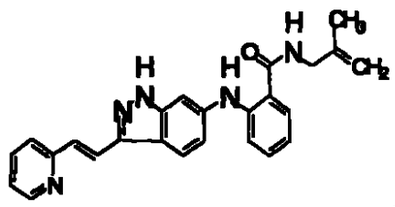


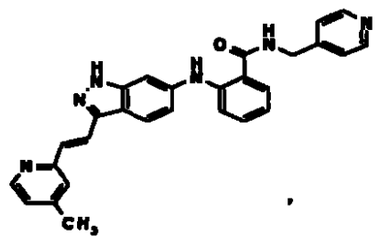


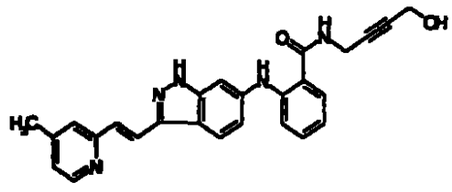


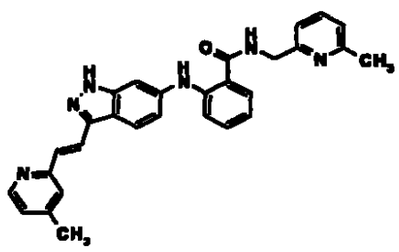


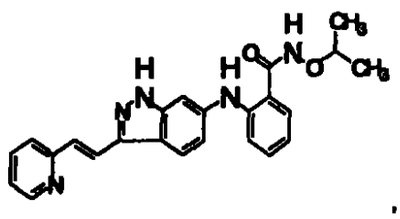


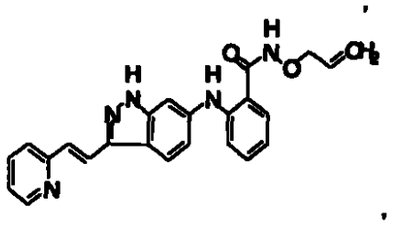


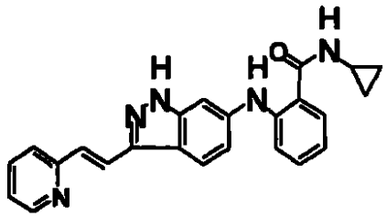


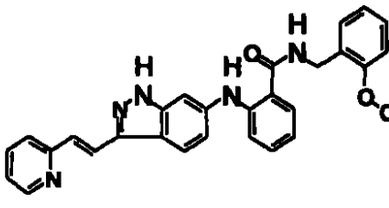


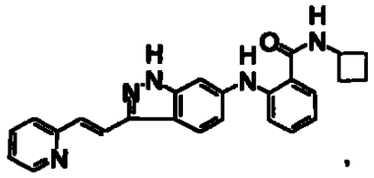


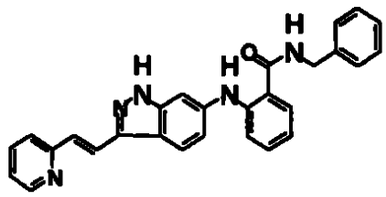


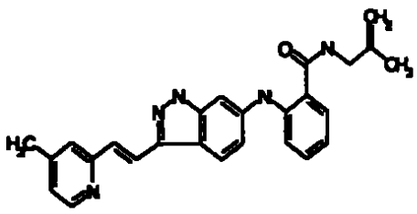


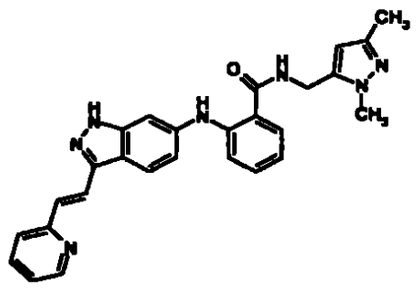


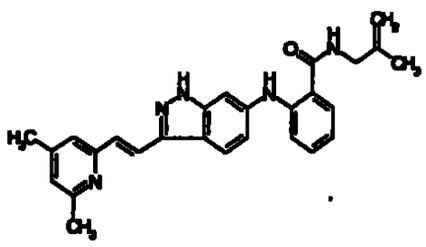


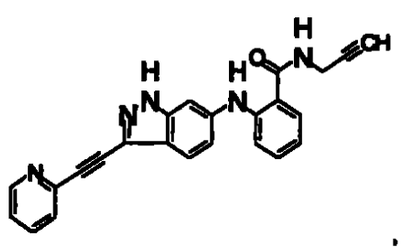


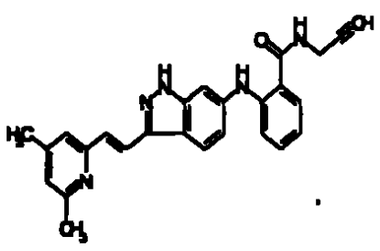


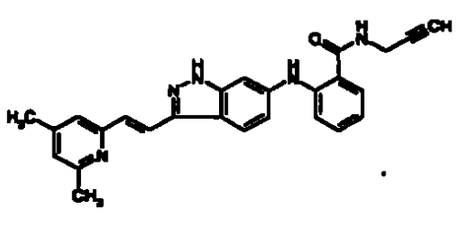


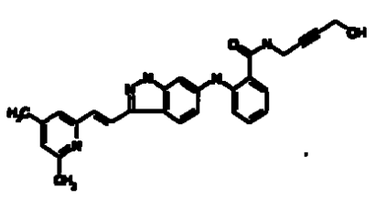


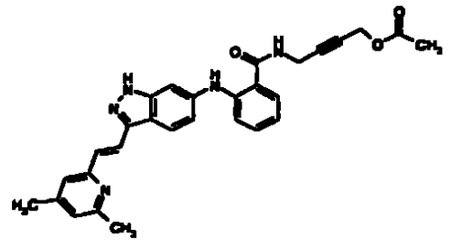


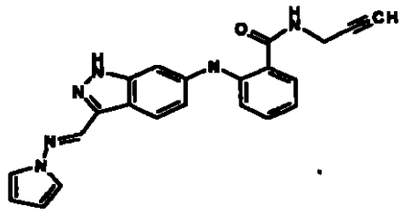


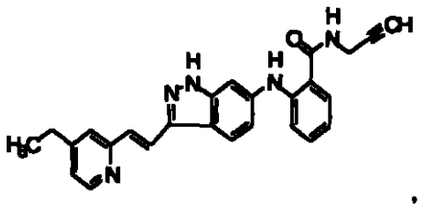


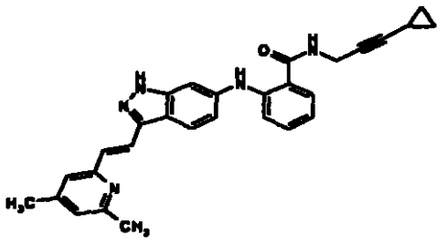


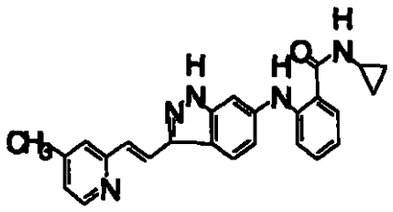


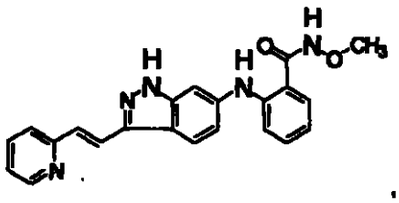


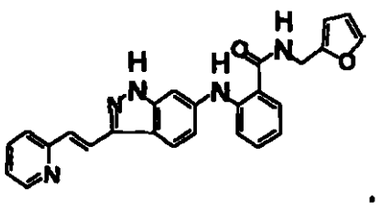


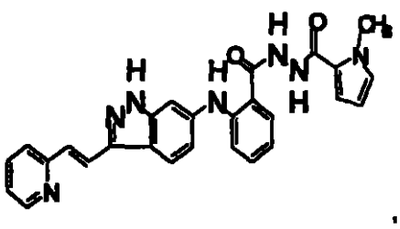


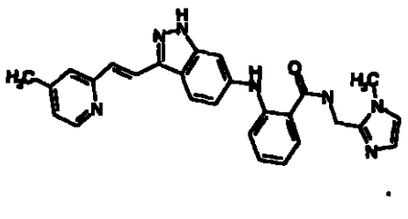


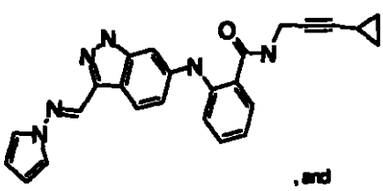






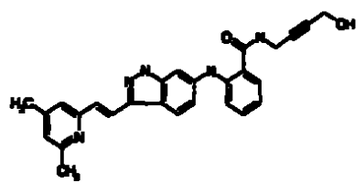






, and

2. A compound represented by the formula



,or a pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt thereof.

3. A method of using a therapeutically effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt as defined in claim 1 or 2 to treat age related macular degeneration in a mammal.

4. A method of using a therapeutically effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt as defined in claim 1 or 2 to treat choroidal neovascularization in a mammal.

5. A method of using a therapeutically effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt as defined in claim 1 or 2 to treat retinopathy in a mammal.

6. The method of claim 5 wherein the retinopathy comprises diabetic retinopathy, vitreoretinopathy, or retinopathy of prematurity.

7. A method of using a therapeutically effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt as defined in claim 1 or 2 to treat retinitis in a mammal.

8. The method of claim 7 wherein the retinitis comprises cytomegalovirus retinitis.

9. A method of using a therapeutically effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt as defined in claim 1 or 2 to treat macular edema in a mammal.

10. A method of using a therapeutically effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt as defined in claim 1 or 2 to treat an ophthalmic disease in a mammal.

11. A pharmaceutical composition comprising:

(a) a therapeutically effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt of claims 1 or 2; and

(b) a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or vehicle therefor.

12. A method of using a therapeutically effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt as defined in claim 1 or 2 to treat a mammalian disease condition mediated by protein kinase activity.

13. A method according to claim 12, wherein the mammalian disease condition is associated with tumor growth, cell proliferation, or angiogenesis.

14. A method of modulating the activity of a protein kinase receptor, comprising contacting the kinase receptor with an effective amount of a compound, pharmaceutically acceptable prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt as defined in claim 1 or 2.

15. A method according to claim 14, wherein the protein kinase receptor is a VEGF receptor.

Ref.: 03868

COMPUESTOS DE INDAZOL Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA INHIBIR PROTEINQUINASAS, Y PROCEDIMIENTOS PARA SU USO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELATIVAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 60/434.902, presentada el 19 de diciembre de 2002, incorporada en esta memoria descriptiva en su totalidad como referencia para todos los propósitos.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere a compuestos de indazol que median y/o inhiben enfermedades oftálmicas y la actividad de ciertas proteinquinasas, y a composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos. La invención también se dirige al uso terapéutico o profiláctico de dichos compuestos y composiciones, y a procedimientos de tratamiento de enfermedades oftálmicas y cáncer así como otros estados de enfermedades asociados con angiogénesis y/o proliferación celular no deseada, mediante la administración de cantidades eficaces de dichos compuestos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Varias enfermedades y afecciones del segmento del ojo ponen en peligro la visión. La degeneración macular relativa a la edad (abreviadamente en inglés ARMD o AMD), neovascularización coroidal (abreviadamente en inglés CNV), retinopatías (por ejemplo, retinopatía diabética, vitreorretinopatía, retinopatía de prematurez), retinitis (por ejemplo, retinitis por citomegalovirus

(abreviadamente en inglés CMV)), uveitis, edema macular y glaucoma son varios ejemplos.

La degeneración macular relativa a la edad (abreviadamente en inglés ARMD o AMD) es la causa principal de ceguera en los ancianos. La ARMD ataca el centro de visión y lo hace borroso, haciendo la lectura, conducción y otras tareas detalladas difíciles o imposibles. Aproximadamente 200.000 nuevos casos de ARMD se producen cada año sólo en los Estados Unidos. Estimaciones actuales revelan que aproximadamente el cuarenta por ciento de la población mayor de 75 años de edad, y aproximadamente el veinte por ciento de la población mayor de 60, sufren algún grado de degeneración macular. ARMD "húmeda" es el tipo de ARMD que más a menudo ocasiona ceguera. En ARMD húmeda, los vasos sanguíneos coroidales formados nuevamente (neovascularización coroidal (abreviadamente en inglés CNV)) pierden fluido y producen daño progresivo a la retina. En el caso particular de CNV en ARMD, se están desarrollando actualmente dos procedimientos principales de tratamiento, (a) fotocoagulación y (b) el uso de inhibidores de angiogénesis.

Sin embargo, la fotocoagulación puede ser perjudicial para la retina y es impracticable cuando la CNV está en la proximidad de la fóvea. Además, la fotocoagulación a menudo da como resultado CNV recurrente con el tiempo. Se está ensayando también la administración oral de compuestos anti-angiogénicos como un tratamiento sistémico para ARMD. Sin embargo, debido a las restricciones metabólicas específicas de los fármacos, la administración sistémica proporciona habitualmente niveles de fármacos subterapéuticos al ojo. Por lo tanto, para conseguir concentraciones eficaces de fármacos

intraoculares, se requiere bien una dosis inaceptablemente alta o dosis repetitivas convencionales. También se han desarrollado diversos implantes para administrar compuestos anti-angiogénicos localmente en el ojo. Los ejemplos de dichos implantes se describen en la patentes de Estados Unidos Nº 5.824.072 de Wong, la patente de Estados Unidos Nº 5.476.511 de Gwon y col., y la patente de Estados Unidos Nº 5.773.019 de Ashton y col., cada una de las cuales se incorpora en esta memoria descriptiva en su totalidad como referencia para todos los propósitos.

Enfermedades neovasculares del ojo

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención también proporciona procedimientos para tratar enfermedades neovasculares del ojo, que incluyen por ejemplo, neovascularización córnea, glaucoma neovascular, retinopatía diabética proliferativa, fibroblasia retrolental y degeneración macular.

En resumen, la neovascularización corneal como resultado de lesión al segmento anterior es una causa significativa de descenso de agudeza visual y de ceguera, y un factor de riesgo importante para el rechazo de aloinjertos de córnea. Como han descrito Burger y col., Lab, Inves. 48: 169 – 180, 1983, incorporada en esta memoria descriptiva en su totalidad como referencia para todos los propósitos, la angiogénesis de córnea incluye tres fases: un período latente prevascular, neovascularización activa y maduración y regresión vascular. La identidad y mecanismo de diversos factores angiogénicos, que incluyen elementos de la respuesta inflamatoria, tales como leucocitos, plaquetas, citoquinas y eicosanoides, o constituyentes de plasma no identificados todavía tienen que revelarse.

Actualmente no existe terapia clínicamente satisfactoria para la inhibición de neovascularización o regresión de córnea de nuevos vasos córneos existentes. Los corticosteroides tópicos parecen tener alguna utilidad clínica, presumiblemente limitando la inflamación del estroma.

De este modo, en un aspecto de la presente invención se proporcionan procedimientos para tratar enfermedades neovasculares del ojo tal como neovascularización de córnea (incluyendo neovascularización de injerto córneo), que comprende la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica (como se ha descrito anteriormente) a la córnea, de forma que se inhibe la formación de vasos sanguíneos. En resumen, la córnea es un tejido que normalmente carece de vasos sanguíneos. Sin embargo, en ciertas afecciones patológicas los capilares pueden extenderse en el interior de la córnea desde el plexo vascular pericorneal del limbo. Cuando la córnea se llega a vascularizar, también se nubla, dando como resultado un descenso en la agudeza visual del paciente. La pérdida visual puede llegar a ser completa si la córnea se hace opaca completamente.

Los vasos sanguíneos se pueden introducir en la córnea en una diversidad de patrones y profundidades, dependiendo del procedimiento que provoca la neovascularización. Estos patrones se han definido tradicionalmente por oftalmólogos en los siguientes tipos: pannus (queratitis superficial crónica) tracomatoso, pannus leproso, pannus filctenulosuo pannus degenerativo y pannus glaucomatoso. El estroma corneal también puede estar invadido por ramas de la arteria ciliar anterior (denominada vascularización intersticial) que produce diversas lesiones clínicas distintas: bucles terminales, un patrón "de

tipo cepillo", una forma de umbela, una forma de red, arcadas intersticiales (de vasos episclerales) y vasos irregulares aberrantes.

Una amplia diversidad de trastornos pueden dar como resultado neovascularización corneal, incluyendo, por ejemplo, infecciones corneales (por ejemplo, tracoma, queratitis por herpes simple, leismaniasis y oncocerciasis), procesos inmunológicos (por ejemplo, rechazo de transplantes y síndrome de Stevens – Johnson), quemaduras por álcalis, trauma, inflamación (de cualquier causa), estados de deficiencia tóxica y nutricional y como una complicación en el uso de lentes de contacto.

Aunque la causa de neovascularización corneal puede variar, la respuesta de la córnea a la lesión y el posterior crecimiento hacia dentro vascular es similar independientemente de la causa. En resumen, la localización de la lesión parece ser de importancia ya que solamente aquellas lesiones situadas en una distancia crítica del limbo provocará una respuesta angiogénica. Esto es probablemente debido al hecho de que los factores angiogénicos responsables de provocar la invasión vascular se crean en el sitio de la lesión, y deben difundirse en el sitio de los vasos sanguíneos más próximo (el limbo) con el fin de ejercer su efecto. Más allá de una cierta distancia del limbo, esto no debería ser posible y no se induciría crecimiento del endotelio límbico en la córnea. Probablemente varios factores angiogénicos están implicados en este proceso, muchos de los cuales son productos de la respuesta inflamatoria. De hecho, la neovascularización de la córnea parece producirse solamente en asociación con un infiltrado celular inflamatorio, y el grado de angiogénesis es proporcional al grado de la reacción inflamatoria. Además el edema corneal facilita el crecimiento hacia dentro de los vasos

sanguíneos mediante el aflojamiento del marco del estroma corneal y proporcionando una ruta de "resistencia mínima" a través de la cual los capilares pueden crecer.

Después de la reacción inicial inflamatoria, el crecimiento capilar en la córnea procede de la misma manera que se produce en otros tejidos. Las células endoteliales de los capilares límbicos y venulas normalmente inactivas se estimulan para dividirse y migrar. Las células endoteliales se proyectan hacia fuera de sus vasos de origen, digieren la membrana basal circundante y el tejido a través del cual viajarán y migran hacia la fuente del estímulo angiogénico. Los brotes ciegos terminales adquieren un lumen y después se anastomosan juntos para formar bucles capilares. El resultado final es el establecimiento de un plexo vascular en el interior del estroma corneal.

Los factores y composiciones anti-angiogénicas de la presente invención son útiles ya que bloquean los efectos estimuladores de los promotores de angiogénesis, reduciendo la división celular endotelial, disminuyendo la migración celular endotelial y dañando la actividad de las enzimas proteolíticas secretadas por el endotelio.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Dentro de las realizaciones particularmente preferidas de la invención, se puede preparar un factor anti-angiogénico para administración tópica en solución salina (combinado con cualquiera de los agentes conservantes y antimicrobianos usados comúnmente en preparaciones oculares), y administrarse en forma de gotas oculares. La solución o suspensión del factor anti-angiogénico se puede preparar en estado puro y administrarse varias veces al día. Como alternativa, las composiciones anti-angiogénicas,

preparadas como se ha descrito anteriormente, también se pueden administrar directamente a la córnea.

En las realizaciones preferidas, la composición anti-angiogénica se prepara con un polímero mucoadhesivo que se une a la córnea. En realizaciones adicionales, los factores anti-angiogénicos o composiciones anti-angiogénicas se pueden utilizar como un auxiliar a la terapia de esteroides convencional.

La terapia tópica también puede ser útil profilácticamente en lesiones corneales que se sabe que tienen una alta probabilidad de inducir una respuesta angiogénica (tal como quemaduras químicas). En estos casos el tratamiento, probablemente en combinación con esteroides, se puede emplear inmediatamente para ayudar a prevenir complicaciones posteriores.

En otras realizaciones, las composiciones anti-angiogénicas descritas anteriormente se pueden inyectar directamente en el estroma corneal por un oftalmólogo bajo dirección microscópica. El sitio preferido de inyección puede variar con la morfología de la lesión particular, pero el objetivo de la administración sería situar la composición en el frente delantero de la vasculatura (es decir, intercalado entre los vasos sanguíneos y la córnea normal). En la mayoría de los casos esto implicaría inyección córnea perilímbica para "proteger" la córnea del avance de los vasos sanguíneos. Este procedimiento también se puede utilizar brevemente después de una lesión corneal con el fin de evitar profilácticamente la neovascularización corneal. En esta situación el material se puede inyectar en la córnea perilímbica intercalado entre la lesión corneal y su alimentación sanguínea límbica potencial no deseada. Dichos procedimientos también se pueden utilizar de una manera

similar para evitar la invasión capilar de córneas transplantadas. En una forma de liberación sostenida las inyecciones podrían ser solamente necesarias 2 – 3 veces al año. También se podría añadir asteroide a la solución de inyección para reducir la inflamación que se produce de la propia inyección.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan procedimientos para tratar glaucoma neovascular, que comprende la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica al ojo, de manera que se inhiba la formación de los vasos sanguíneos.

En resumen, el glaucoma neovascular es una afección patológica en la que se desarrollan nuevos capilares en el iris del ojo. Habitualmente la angiogénesis se origina de los vasos localizados en el margen de la pupila y progresa a través de la raíz del iris y en la malla trabecular. Los fibroblastos y otros elementos tisulares conectivos se asocian al desarrollo capilar y se desarrolla una membrana fibrovascular que se extiende a través de la superficie anterior del iris. Eventualmente este tejido alcanza el ángulo de la cámara anterior donde forma sinequias. Estas sinequias a su vez se unen, se cicatrizan y se contraen para cerrar por último el ángulo de la cámara anterior. La formación de cicatriz evita el drenaje adecuado de humor acuoso a través del ángulo y en la malla trabecular, dando como resultado un incremento de la presión intraocular que puede dar como resultado ceguera.

El glaucoma neovascular generalmente se produce como una complicación de enfermedades en las que es predominante la isquemia retinal. En particular, aproximadamente un tercio de los pacientes con este trastorno tienen retinopatía diabética y 28% tienen oclusión de las venas centrales de la

retina. Otras causas incluyen desprendimiento de retina crónico, glaucoma de fase terminal, enfermedad obstructiva de la arteria carótida, fibroplasia retrolental, anemia de células falciformes, tumores intraoculares y fístulas cavernosas carótidas. En sus fases tempranas, el glaucoma neovascular se puede diagnosticar mediante biomicroscopía de hendidura de alta magnificación, donde descubre capilares pequeños, dilatados y desorganizados (que pierden fluoresceína) en la superficie del iris. La gonioscopía posterior demuestra obliteración progresiva del ángulo de la cámara anterior mediante bandas fibrovasculares. Mientras que el ángulo de la cámara anterior todavía está abierto, las terapias conservadoras pueden ser de ayuda. Sin embargo, una vez que se cierra el ángulo se requiere intervención quirúrgica con el fin de aliviar la presión.

Por lo tanto, en una realización de la invención se pueden administrar tópicamente factores anti-angiogénicos (bien solos o en una composición anti-angiogénica, como se ha descrito anteriormente) al ojo con el fin de tratar formas tempranas de glaucoma neovascular.

En otras realizaciones de la invención, las composiciones anti-angiogénicas se pueden implantar mediante inyección de la composición en la región del ángulo de la cámara anterior. Esto proporciona un incremento localizado sostenido de factor anti-angiogénico y evita el crecimiento de los vasos sanguíneos en el área. Las composiciones anti-angiogénicas implantadas o inyectadas que se sitúan entre los capilares delanteros del iris y el ángulo de la cámara anterior pueden "defender" el ángulo de abertura de la neovascularización. Ya que los capilares no crecerán en un radio significativo de la composición anti-angiogénica, se podría mantener la abertura del ángulo.

En otras realizaciones, las composiciones anti-angiogénicas se pueden también situar en cualquier lugar de manera que el factor anti-angiogénico se libere continuamente en el humor acuoso. Esto incrementaría la concentración del factor anti-angiogénico en el humor, que a su vez baña la superficie del iris y sus capilares anormales, por lo tanto proporcionando otro mecanismo mediante el que distribuye la medicación. Estas modalidades terapéuticas también pueden ser útiles profilácticamente y en combinación con tratamientos existentes.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan procedimientos para tratar retinopatía proliferativa diabética, que comprende la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-angiogénica a los ojos, de manera que se inhiba la formación de los vasos sanguíneos.

En resumen, la patología de retinopatía diabética se cree que es similar a la descrita anteriormente para glaucoma neovascular. En particular, la retinopatía diabética antecedente se cree que se convierte en retinopatía diabética proliferativa bajo la influencia de hipoxia retinal. En general, el tejido neovascular brota del nervio óptico (habitualmente en 10 mm del borde), y desde la superficie de la retina en regiones donde la perfusión del tejido es escasa. Inicialmente los capilares crecen entre la membrana limitante interna de la retina y la superficie posterior del vítreo. Eventualmente, los vasos crecen en el vítreo y a través de la membrana limitante interna. A medida que el vítreo se contrae, la tracción se aplica a los vasos, dando a menudo como resultado cortes en los vasos y cegando el vítreo debido a la hemorragia. La tracción fibrosa de la cicatrización en la retina puede también producir desprendimiento

de la retina.

La terapia convencional de elección es fotocoagulación panretinal para disminuir el tejido retinal, y por lo tanto diminuir las demandas de oxígeno retinal. Aunque inicialmente eficaz, existe una gran tasa de recaída con nuevas lesiones que se forman en otras partes de la retina. Las complicaciones de esta terapia incluyen una disminución de la visión periférica de hasta 50% de los pacientes, abrasiones mecánicas de la córnea, formación de cataratas inducidas por láser, glaucoma agudo y estimulación de crecimiento neovascular subretinal (que puede dar como resultado pérdida de visión). Como resultado, este procedimiento se realiza solamente cuando están presentes varios factores de riesgo, y la relación riesgo – beneficio está claramente a favor de la intervención.

Por lo tanto, en las realizaciones particularmente preferidas de la invención, la retinopatía diabética proliferativa se puede tratar mediante inyección de un (os) factor (es) anti-angiogénico (s) (o composición anti – angiogénica) en el humor acuoso o el vítreo, con el fin de incrementar la concentración local del factor anti-angiogénico en la retina. Preferiblemente, este tratamiento se debería iniciar antes de la adquisición de enfermedad grave que requiere fotocoagulación. En otras realizaciones de la invención, las arterias que alimentan las lesiones neovasculares se pueden embolizar (utilizando composiciones anti-angiogénicas, como se ha descrito anteriormente).

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan procedimientos para tratar fibroblasia retrolental, que comprende la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuicamente eficaz de un factor

anti-angiogénico (o composición anti-angiogénica) al ojo, de manera que se inhiba la formación de vasos sanguíneos.

En resumen, la fibroblasia retrolental es una afección que se produce en niños prematuros que reciben terapia de oxígeno. La vasculatura retinal periférica, particularmente en el lado temporal, no se llega a formar totalmente hasta el final de la vida fetal. Oxígeno excesivo (incluso niveles que estarían fisiológicamente en orden) y la formación de radicales libres de oxígeno se cree que son importantes produciendo daño en los vasos sanguíneos de la retina inmadura. Estos vasos se estrechan y después se llegan a destruir estructuralmente con la exposición al oxígeno. Como resultado, la retina periférica falla de vascularizar y se produce isquemia retinal. En respuesta a la isquemia se induce neovascularización en la unión de la retina normal e isquémica.

En el 75% de los casos estos vasos entran en regresión espontáneamente. Sin embargo, en el 25% restante existe un crecimiento capilar continuado, contracción del componente fibrovascular y tracción tanto en los vasos como en la retina. Esto da como resultado hemorragia en el vítreo y/o desprendimiento de retina que puede conducir a ceguera. El glaucoma neovascular por cierre angular es también una complicación de esta afección.

Ya que es a menudo imposible determinar qué casos se resolverán espontáneamente y cuales se transformarán en graves, tratamiento convencional (es decir, cirugía) se comienza generalmente solamente en pacientes con una enfermedad establecida y una patología bien desarrollada. Este planteamiento "esperar y ver" excluye la intervención temprana y permite el progreso de la enfermedad en el 25% que sigue un curso complicado. Por lo

tanto, en una realización de la invención, la administración tópica de factores anti-angiogénicos (o composiciones anti-angiogénicas, como se ha descrito anteriormente) se puede llevar a cabo en niños que tienen un alto riesgo de desarrollar esta afección en un intento de cortar la incidencia de progresión de fibroplasia retrolental. En otras realizaciones, se pueden utilizar inyecciones intravítreas y/o implantes intraoculares de una composición anti-angiogénica. Dichos procedimientos se prefieren particularmente en casos de una enfermedad establecida, con el fin de reducir la necesidad de cirugía.

Proteinquinasas

Las proteinquinasas son una familia de enzimas que cataliza la fosforilación del grupo hidroxilo de restos específicos de tirosina, serina o treonina en proteínas. Típicamente, dicha fosforilación perturba drásticamente la función de la proteína, y de esta manera las proteinquinasas son fundamentales en la regulación de una amplia diversidad de procesos celulares, que incluyen metabolismo, proliferación celular, diferenciación celular y supervivencia celular. De las muchas funciones celulares diferentes en las que se sabe que se requiere la actividad de las proteinquinasas, algunos procesos representan dianas atractivas para intervención terapéutica para ciertos estados de enfermedad. Dos ejemplos son angiogénesis y control de ciclo celular, en los que las proteinquinasas juegan un papel fundamental; estos procedimientos son esenciales para el desarrollo de tumores sólidos así como de otras enfermedades.

La angiogénesis es el mecanismo mediante el cual se forman nuevos capilares a partir de vasos existentes. Cuando se requiera, el sistema vascular tiene el potencial de generar nuevas mallas capilares con el fin de mantener la

función adecuada de tejidos y órganos. Sin embargo, en el adulto, la angiogénesis está claramente limitada, produciéndose solamente en el proceso de cicatrización de heridas y neovascularización del endometrio durante la menstruación. Véase Merenmies y col., *Cell Growth & Differentiation*, 8, 3 – 10 (1997), incorporado en esta memoria descriptiva como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Por otra parte, la angiogénesis no deseada es una marca de varias enfermedades, tales como retinopatías, psoriasis, artritis reumatoide, degeneración macular relativa a la edad (abreviadamente AMD) y cáncer (tumores sólidos). Folkman, *Nature Med.*, 1, 27 – 31 (1995), incorporada en esta memoria descriptiva como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Se ha mostrado que las proteinquinasas que están implicadas en el proceso angiogénico incluyen tres miembros de la familia de tirosina quinasa de receptores de factor de crecimiento: VEGF-R2 (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2, también conocido como KDR (receptor del dominio de inserción de quinasa) y como FLK-1); FGF-R (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos); y TEK (también conocido como Tie-2).

VEGF-R2, que se expresa solamente en las células endoteliales, se une al potente factor de crecimiento angiogénico VEGF y media la transducción de la señal posterior a través de la activación de su actividad intracelular quinasa. De este modo, se espera que la inhibición directa de la actividad quinasa de VEGF-R2 dará como resultado la reducción de angiogénesis incluso en presencia de VEGF exógeno (véase Strawn y col., *Cancer Research*, 56, 3540 – 3545 (1996)), como se ha mostrado con mutantes de VEGF-R2 que no median en la transducción de la señal. Millauer y col., *Cancer Research*, 56,

1615 – 1620 (1996). Además, VEGF-R2 parece que no tiene ninguna función en el adulto más allá de la mediación de la actividad angiogénica de VEGF. Por lo tanto, se esperaría que un inhibidor selectivo de la actividad quinasa de VEGF-R2 exhibiera poca toxicidad.

De manera similar, FGF-R se une a los factores de crecimiento angiogénicos aFGF y bFGF y media posteriormente la transducción de la señal intracelular. Recientemente, se ha sugerido que los factores de crecimiento tales como bFGF pueden jugar un papel crítico en la inducción de angiogénesis en tumores sólidos que han alcanzado un cierto tamaño. Yoshiji y col., *Cancer Research*, 57, 3924 – 3928 (1997). Sin embargo, a diferencia de VEGF-R2, FGF-R se expresa en numerosos tipos de células diferentes por todo el cuerpo y puede o puede no jugar papeles importantes en otros procedimientos fisiológicos normales en el adulto. Sin embargo, la administración sistémica de un inhibidor de molécula pequeña de la actividad quinasa de FGF-R se ha indicado que bloquea la angiogénesis inducida por bFGF en ratones sin toxicidad aparente. Mohammad y col., *EMBO Journal*, 17, 5996 – 5904 (1998).

TEK (también conocido como Tie-2) es otra tirosina quinasa receptora expresada solamente en células endoteliales que se ha mostrado que juega un papel en angiogénesis. La unión del factor angiopoyetina-1 da como resultado autofosforilación del dominio quinasa de TEK y da como resultado un proceso de transducción de la señal que parece mediar la interacción de las células endoteliales con células de soporte periendotelial, facilitando por lo tanto la maduración de vasos sanguíneos formados nuevamente. Por otra parte, el factor angiopoyetina-2 parece antagonizar la acción de angiopoyetina-1 sobre TEK e interrumpe la angiogénesis. Maisonpierre y col., *Science*, 277, 55 – 60

(1997).

Como resultado de los desarrollos descritos anteriormente, se ha propuesto tratar la angiogénesis mediante el uso de compuestos que inhiben la actividad quinasa de VEGF-R2, FGF-R, y/o TEK. Por ejemplo, la publicación internacional WIPO Nº WO 97/34876 describe ciertos derivados de cinolina que son inhibidores de VEGF-R2, que se pueden usar para el tratamiento de estados de enfermedad asociados con angiogénesis anormal y/o permeabilidad vascular aumentada tal como cáncer, diabetes, psoriasis, artritis reumatoide, sarcoma de Kaposi, hemangioma, nefropatías agudas y crónicas, ateroma, retinosis arterial, enfermedades autoinmunes, inflamación aguda y enfermedades oculares con proliferación de vasos retinales.

La fosforilasaquinasa activa la glucógenofosforilasa, incrementando de esta manera la rotura de glucógeno y la liberación de la glucosa hepática. La producción de glucosa hepática se desregula en la diabetes tipo 2, y es la causa primaria de hiperglucemia por ayuno, que da como resultado muchas de las complicaciones secundarias que aquejan a estos pacientes. De este modo, la reducción de liberación de glucosa del hígado reduciría los niveles elevados de glucosa en plasma. Por lo tanto, los inhibidores de fosforilasaquinasa deberían disminuir la actividad de la fosforilasa y la glicogenólisis, reduciendo de esta manera la hiperglucemia en pacientes.

Otra respuesta fisiológica a VEGF es hiperpermeabilidad vascular, que se ha propuesto que juega un papel en las fases tempranas de la angiogénesis. En tejidos isquémicos, tales como los que se producen en el cerebro de víctimas de accidentes vasculares, la hipoxia dispara la expresión de VEGF, conduciendo a un aumento en la permeabilidad vascular y por último

a edema en los tejidos circundantes. En un modelo de rata de accidente vascular, van Bruggen y col., *J. Clinical Invest.*, 104 1613 – 20 (1999) han mostrado que la administración de un anticuerpo monoclonal a VEGF reduce el volumen de infarto. De este modo, se anticipa que los inhibidores de VEGFR son útiles para el tratamiento de accidentes vasculares.

Además de su papel en angiogénesis, las proteinquinasas también juegan un papel crucial en el control del ciclo celular. La proliferación celular no controlada es la insignia de cáncer. La proliferación celular en respuesta a diversos estímulos se manifiesta por una desregulación del ciclo de división celular, el proceso mediante el cual las células se dividen y multiplican. Las células tumorales típicamente han dañado los genes que directa o indirectamente regulan la progresión a lo largo del ciclo de división celular.

Las quinasas dependientes de ciclina (abreviadamente en inglés CDK) son serina-treonina proteinquinasas que juegan papeles críticos en la regulación de las transiciones entre fases diferentes del ciclo celular. Véase, por ejemplo, los artículos recopilados en *Science*, 274, 1643 – 1677 (1996). Los complejos de CDK se forman mediante la asociación de una subunidad reguladora de ciclina (por ejemplo, A, B1, B2, D1, D2, D3 y E) y una subunidad de quinasa catalítica (por ejemplo, cdc2, (CDK1), CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6). Como el nombre da a entender, las CDK muestran una dependencia absoluta de la subunidad de ciclina con el fin de fosforilar sus sustratos diana y diferentes pares de quinasa/ciclina funcionan para regular la progresión a lo largo de las fases específicas del ciclo celular.

La CDK4 complejada a las ciclinas D es la que juega una parte crítica en la iniciación del ciclo de división celular a partir de una fase de reposo o latente

a una en la que las células llegan a comprometerse en la división celular. Esta progresión se somete a una diversidad de mecanismos reguladores de crecimiento, tanto negativos como positivos. Las aberraciones en este sistema de control, particularmente las que afectan a la función de CDK4 se han implicado en el progreso de las células hasta el estado altamente proliferativo característico de las malignidades, particularmente melanomas familiares, carcinomas esofágicos y cánceres pancreáticos. Véase, por ejemplo, Kamb, *Trends in Genetics*, 11, 136 – 140 (1995); Kamb y col., *Science*, 264, 436 – 440 (1994).

Múltiples publicaciones describen una diversidad de compuestos químicos útiles contra una diversidad de dianas terapéuticas. Por ejemplo, las publicaciones internacionales WIPO números WO 99/23077 y WO 99/23076 describen compuestos que contienen indazol que tienen actividad inhibitoria de fosfodiesterasa de tipo IV producida por un reemplazamiento bioisóstero de indazol por catecol. La patente de Estados Unidos Nº 5.760.028 describe heterociclos que incluyen ácido 3-[1-[3-(imidazolin-2-ilamino)propil]indazol-5-ilcarbonilamino]-2-(benciloxicarbonilamino)propiónico, que es útil como antagonista de la $\alpha_v\beta_3$ integrina y receptores relativos de proteínas adhesivas de superficie celular. La publicación internacional WIPO Nº WO 98/09961 describe ciertos derivados de indazol y su uso como inhibidores de fosfodiesterasa (abreviadamente en inglés (PDE) de tipo IV o la producción de factor de necrosis tumoral (abreviadamente en inglés TNF) en un mamífero. Las recientes adiciones a la biblioteca virtual de compuestos conocidos incluyen los descritos como que son agentes terapéuticos antiproliferativos que inhiben las CDK. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.621.082 de

Xiong y col., describe ácido nucleico que codifica un inhibidor de CDK6, y la publicación de patente europea Nº 0 666 270 A2 describe péptidos y miméticos de péptidos que actúan como inhibidores de CDK1 y CDK2. La publicación internacional WIPO Nº WO 97/16447 describe ciertos análogos de cromonas que son inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina, en particular de complejos CDK/ciclina tales como CDK4/ciclina D1, que se pueden usar para inhibir proliferación celular excesiva o anormal, y por lo tanto para tratar cáncer. La publicación internacional WIPO Nº WO 99/21845 describe derivados de 4-aminotiazol que son útiles como inhibidores de CDK. Cada una de las patentes y/o solicitud enumeradas anteriormente se incorpora en esta memoria descriptiva como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Sin embargo, todavía existe una necesidad de compuestos de moléculas pequeña que se pueden sintetizar fácilmente y son eficaces en la inhibición de una o más CDK o complejos CDK/ciclina. Debido a que la CDK4 puede servir como un activador general de división celular en la mayoría de las células, y los complejos de CDK4 y ciclinas de tipo D gobiernan la fase temprana G_1 del ciclo celular, existe necesidad de inhibidores eficaces de CDK4 y complejos de ciclinas de tipo D de los mismos, para tratar uno o más tipos de tumores. También, los papeles fundamentales de ciclina E/CDK2 y ciclina B/CDK1 quinasas en la fase G_1/S y transiciones G_2/M, respectivamente, ofrecen unas dianas adicionales para intervención terapéutica en la supresión de la progresión del ciclo celular desregulada en cáncer.

Otra proteinquinasa, CHK1, juega un papel importante como punto de control en la progresión del ciclo celular. Los puntos de control son sistemas de control que coordinan progresión del ciclo celular influenciando la formación,

activación y posterior inactivación de las quinasas dependientes de ciclina. Los puntos de control evitan la progresión del ciclo celular en momentos inadecuados, mantienen el balance metabólico de las células mientras que la célula se detiene, y en algunos casos pueden inducir apoptosis (muerte celular programada) cuando no se han reunido los requerimientos de los puntos de control. Véase, por ejemplo, O'Connor, *Cancer Surveys*, 29, 151 – 182 (1997); Nurse, *Cell*, 91, 865 – 867 (1997); Hartwell y col., *Science*, 266, 1821 – 1828 (1994); Hartwell y col., *Science*, 246, 629 – 634 (1989).

Una serie de puntos de control controla la integridad del genoma y, tras detectar daños en el DNA, estos "puntos de control de lesión de DNA" bloquean la progresión del ciclo celular en las fases G_1 y G_2, y retrasan la progresión a través de la fase S. O'Connor, *Cancer Surveys*, 29, 151 – 182 (1997); Hartwell y col., *Science*, 266, 1821 – 1828 (1994). Esta acción permite los procesos de reparación de DNA que completan sus tareas antes de la replicación del genoma y tiene lugar la posterior separación de este material genético en células nuevas hijas. Sustancialmente, el gen más comúnmente mutado en cáncer humano, el gen supresor del tumor p53, produce una proteína de punto de control de daño en el DNA que bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G_1 y/o induce apoptosis (muerte celular programada) que sigue al daño en el DNA. Hartwell y col., *Science*, 266, 1821 – 1828 (1994). Se ha mostrado también que el supresor del tumor p53 fortalece la acción de un punto de control de daño en el DNA en la fase G_2 del ciclo celular. Véase, por ejemplo, Bunz y col., *Science*, 28, 1497 – 1501 (1998); Winters y col., *Oncogene*, 17, 673 – 684 (1998); Thompson, *Oncogene*, 15, 3025 – 3035 (1997).

Dada la naturaleza fundamental de la ruta del supresor del tumor p53 en un cáncer humano, se ha buscado activamente las intervenciones terapéuticas que exploten vulnerabilidades en cáncer deficiente en p53. Una vulnerabilidad emergente se sitúa en la operación del punto de control de G_2 en las células cancerosas deficientes en p53. Las células cancerosas, debido a que carecen del control de los puntos de control de G_1, son particularmente vulnerables a la abolición de la última barrera restante que las protege de los efectos anticancerígenos de los agentes dañinos para el DNA: el punto de control de G_2. El punto de control de G_2 se regula mediante un sistema de control que se ha conservado a partir de levaduras a humanos. Es importante en este sistema conservado una quinasa, CHK1, que transduce señales del complejo sensorial de daño en el DNA para inhibir la activación de la ciclina B/Cdc2 quinasa, que promueve la entrada mitótica. Véase, por ejemplo, Peng y col., *Science*, 277, 1501 – 1505 (1997); Sánchez y col., *Science*, 277, 1497 – 1501 (1997). La inactivación de CHK1 se ha mostrado que elimina la detección de G_2 inducida por daños en el DNA causada bien por agentes anticancerígenos como por daño en el DNA endógeno, así como da como resultado la muerte preferencial de las células resultantes deficientes en puntos de control. Véase, por ejemplo, Nurse, *Cell*, 91, 865 – 867 (1997); Weinert, *Science*, 277, 1450 – 1451 (1997); Walworth y col., *Nature*, 363, 368 – 371 (1993); y Al-Khodairy y col., *Molec. Biol. Cell*, 5, 147 – 160 (1994).

La manipulación selectiva del control del punto de control en las células cancerosas podría proporcionar una utilización amplia en regímenes de quimioterapia y radioterapia de cáncer y puede, además, ofrecer una señal común de "inestabilidad genómica" de cáncer humano que se va a explotar

como base selectiva para la destrucción de células cancerosas. Numerosos factores sitúan CHK1 como una diana fundamental en el control de los puntos de control de los daños en el DNA. La explicación de los inhibidores de esta y las quinasas funcionalmente relacionadas tales como Cds1/CHK2, una quinasa recientemente descubierta para cooperar con CHK1 en la regulación de la progresión de la fase S (véase Zeng y col., *Nature*, 395, 507 – 510 (1998); Matsuoka, *Science*, 282, 1893 – 1897 (1998)), podría proporcionar valiosas entidades terapéuticas nuevas para el tratamiento de cáncer.

El receptor de integrina que se une a ECM inicia señales intracelulares mediadas por FAK (quinasa de adhesión focal) que están implicadas en la motilidad celular, proliferación celular y supervivencia. En cánceres humanos, la sobreexpresión de FAK está implicada en la tumorogénesis y potencial metástasis potencial a través de su papel en las rutas de señalización mediadas por integrina.

Las tirosinaquinasas pueden ser del tipo receptor (que tiene dominios extracelulares, de transmembrana e intracelulares) o de tipo no receptor (que son totalmente intracelular). Al menos una de las proteínas tirosinaquinasas de tipo no receptor, llamada, LCK, se cree que media la transducción en células T de una señal de la interacción de una proteína de la superficie celular (Cd4) con un anticuerpo anti-Cd4 reticulado. Una descripción más detallada de las tirosinaquinasas de tipo no receptor se proporciona en Bolen, *Oncogene*, 8, 2025 – 2031 (1993), que se incorpora en esta memoria descriptiva como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Además de las proteinquinasas identificadas anteriormente, se han considerado muchas otras proteinquinasas para ser dianas terapéuticas y

numerosas publicaciones describen inhibidores de la actividad quinasa, como se informa en las siguientes: patente de Estados Unidos Nº 6.534.524, expedida el 18 de marzo de 2003, patente de estados Unidos Nº 6.531.491, expedida el 11 de marzo de 2003, publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 00/38665 (publicada el 6 de julio de 2001), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 97/49688 (publicada el 31 de diciembre de 1997), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 98/23613 (publicada el 4 de junio de 1998), patente de Estados Unidos Nº 6.071.935, expedida el 6 de junio de 2000, publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 96/30347 (publicada el 3 de octubre de 1996), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 96/40142 (publicada el 19 de diciembre de 1996), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 97/13771 (publicada el 17 de abril de 1997), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 95/23141 (publicada el 31 de agosto de 1995), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 03/006059 (publicada el 23 de enero de 2003), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 03/035047 (publicada el 1 de mayo de 2003), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 02/064170 (publicada el 22 de agosto de 2002), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 02/41882 (publicada el 30 de mayo de 2002), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 02/30453 (publicada el 18 de abril de 2002), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 01/85796 (publicada el 15 de noviembre de 2001), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 01/74360 (publicada el 11 de octubre de 2001),

publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 01/74296 (publicada el 11 de octubre de 2001), publicación de la solicitud de patente internacional PCT Nº WO 01/70268 (publicada el 27 de septiembre de 2001), publicación de la solicitud de la patente europea EP Nº 1086705 (publicada el 28 de marzo de 2001) y publicación de la solicitud de la patente internacional PCT Nº WO 98/51344 (publicada el 19 de noviembre de 1998). Las patentes y solicitudes anteriores se incorporan cada una de ellas en esta memoria descriptiva como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Sin embargo, todavía existe una necesidad de inhibidores eficaces de proteinquinasas. Además, como entienden los expertos en la técnica, es deseable que los inhibidores de quinasa posean tanto alta afinidad para la quinasa como las quinasas diana así como una alta selectividad frente a otras proteinquinasas.

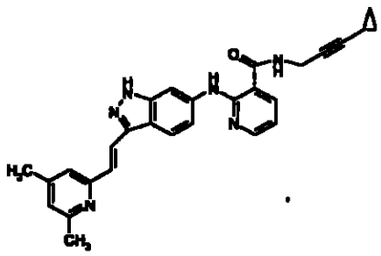
De este modo, un objetivo de la invención es descubrir agentes potentes para el tratamiento de enfermedades oftálmicas, tales como degeneración macular relativa a la edad (abreviadamente en inglés ARMD), neovascularización coroidal (abreviadamente en inglés CNV), retinopatías (por ejemplo, retinopatía diabética, vitreorretinopatía, retinopatía de carácter prematuro), retinitis, (por ejemplo, retinitis por citomegalovirus (abreviadamente en inglés CMV)), uveítis, edema macular y glaucoma.

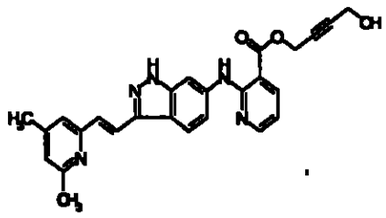
Otro objetivo de la presente invención es descubrir potentes inhibidores de proteinquinasas.

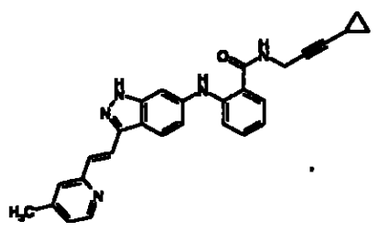
Otro objetivo de la presente invención es descubrir inhibidores eficaces de quinasas que tienen una afinidad fuerte y selectiva para una o más quinasas particulares.

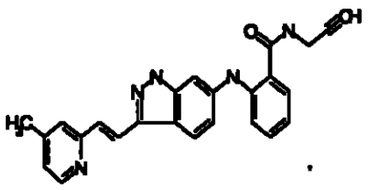
Estos y otros objetivos de la invención, que serán aparentes de la siguiente descripción, se han llevado a cabo mediante el descubrimiento de los compuestos de indazol, fármacos farmacéuticamente aceptables, metabolitos farmacéuticamente activos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos (dichos compuestos, profármacos, metabolitos y sales se denominan colectivamente "agentes") descritos más adelante, que modulan y/o inhiben la actividad de proteinquinasas. Las composiciones farmacéuticas que contienen dichos agentes son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por la actividad quinasa, tal como cáncer, así como otros estados de enfermedades asociados con angiogénesis no deseada y/o proliferación celular, tal como retinopatía diabética, glaucoma neovascular, artritis reumatoide y soriasis. Además, los agentes tienen propiedades ventajosas relativas a la modulación y/o inhibición de la actividad quinasa asociada con VEGF-R, FGF-R, complejos de CDK, CHK1, LCK, TEK, FAK, y/o fosforilasaquinasa.

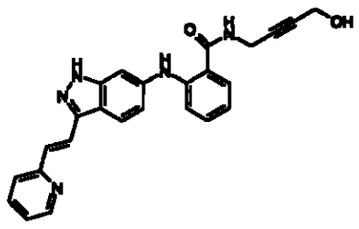
En un aspecto general, la invención se refiere a compuestos que tienen las siguientes estructuras:

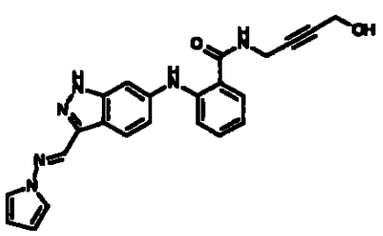


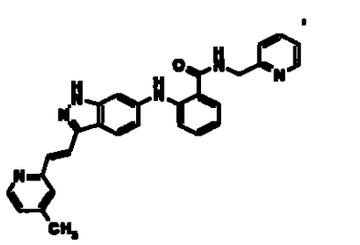


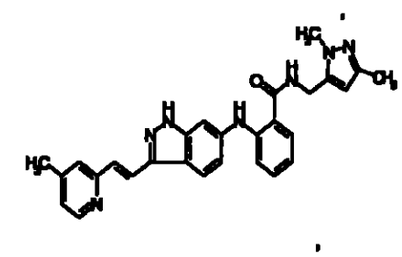


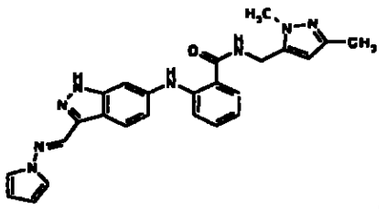


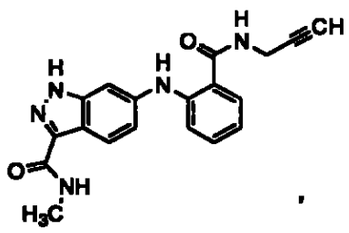


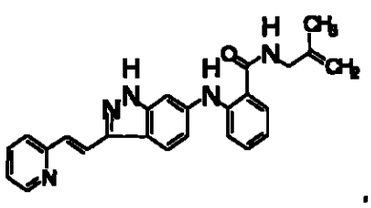


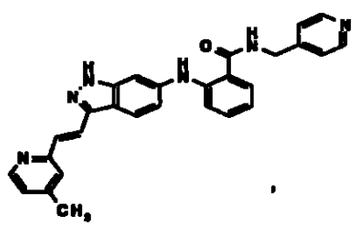


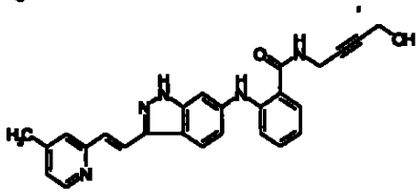


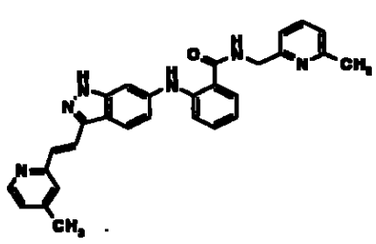


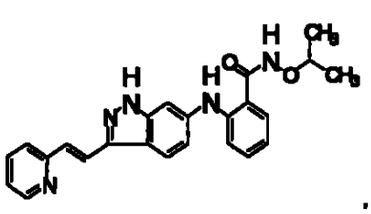


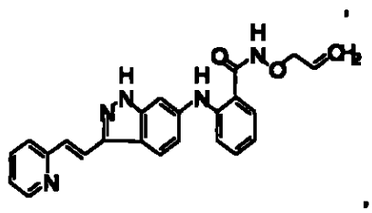


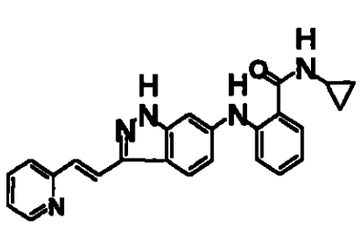


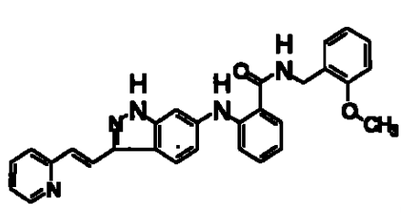


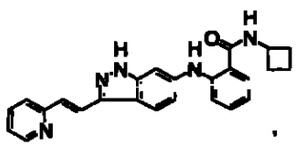


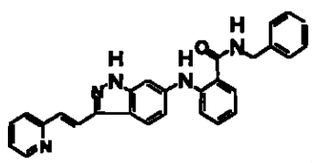


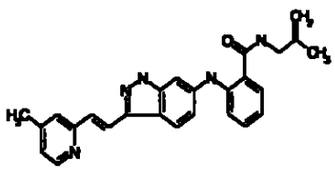


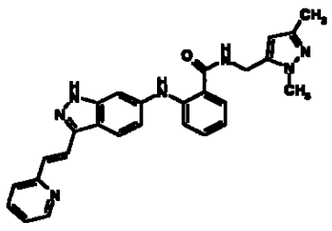


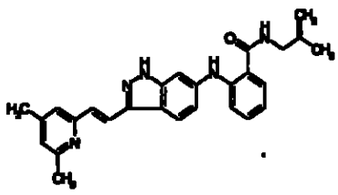


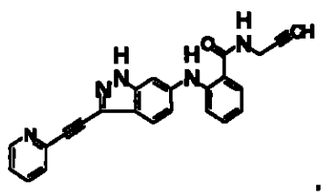


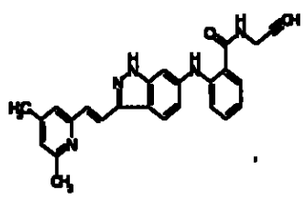


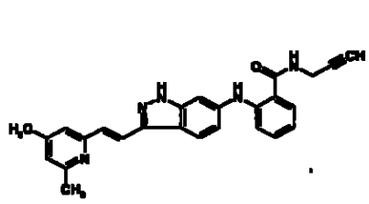


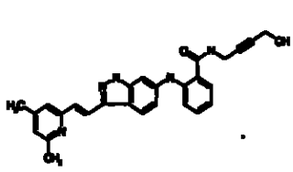


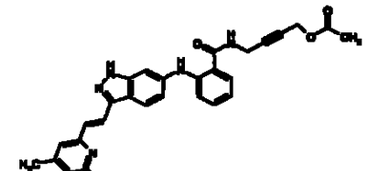


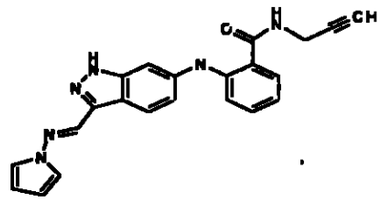


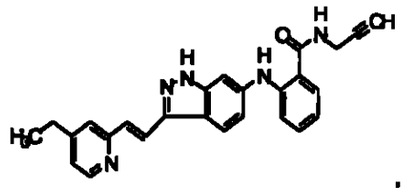


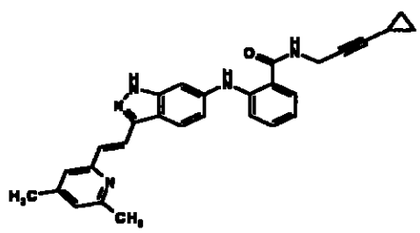


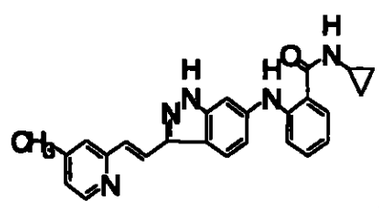


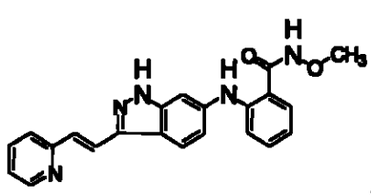


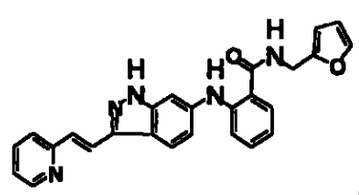


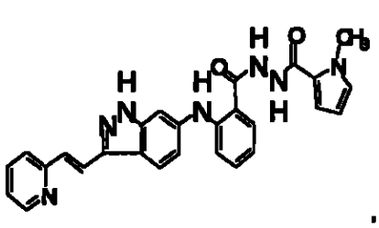


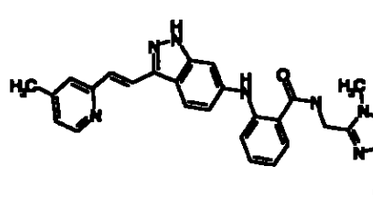


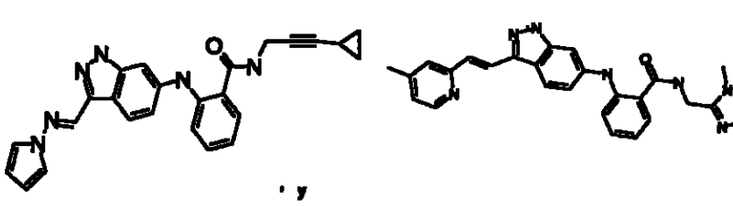












La invención también se refiere a un procedimiento de modulación y/o inhibición de la actividad quinasa de VEGF-R, FGF-R, un complejo de CDK, CHK1, LCK, TEK, FAK y/o fosforilasaquinasa mediante la administración de un compuesto de fórmula I, II, III o IV, o un profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los compuestos preferidos de la presente invención que tienen actividad quinasa selectiva – es decir, poseen actividad significativa contra una o más quinasas específicas mientras que poseen actividad inferior o mínima contra una o más quinasas diferentes. En una realización preferida de la invención, los compuestos de la presente invención son los de fórmula I que poseen sustancialmente mayor potencia contra la tirosinaquinasa del receptor VEGF que contra la tirosinaquinasa del receptor FGR R1. La invención también se refiere a procedimientos de modulación de la actividad de tirosinaquinasa del receptor VEGF sin modular significativamente actividad de la tirosinaquinosa del receptor FGF.

Los compuestos de la invención se pueden usar ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos. Por ejemplo, los compuestos de fórmula I, II, III o IV que poseen actividad antiangiogénica se puede coadministrar con agentes quimioterapéuticos citotóxicos, como taxol, taxotere, vinblastina, cisplatino, doxorrubicina, adrimicina y similares, para producir un efecto antitumoral potenciado. La potenciación aditiva o sinérgica del efecto terapéutico se puede también obtener mediante la coadministración de los compuestos de fórmula I, II, III o IV que poseen actividad antiangiogénica con otros agentes antiangiogénicos, tales como combretastatina A-4, endostatina, priniomastat, celecoxib, rofocoxib, EMD

121974, IM862, anticuerpos monoclonales anti-VEGF, y anticuerpos monoclonales anti-KDR. Las combinaciones adicionales se ejemplifican en los documentos WO 0038716, WO 00387171, WO 0038715, WO 0038730, WO 0038718, WO 0038665, WO 0037107, WO 0038786, WO 0038719, todos presentados simultáneamente el 22 de diciembre de 1999, incorporados en esta memoria descriptiva como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas, comprendiendo cada una de ellas una cantidad eficaz de un agente seleccionado entre los compuestos de fórmula I y sales farmacéuticamente aceptables, metabolitos farmacéuticamente activos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para dicho agente. La invención además proporciona procedimientos de tratamiento de enfermedades/afecciones oftálmicas y cáncer así como otros estados de enfermedades asociadas con angiogénesis y/o proliferación celular no deseadas, que comprende la administración de cantidades eficaces de dicho agente a un paciente en necesidad de dicho tratamiento.

Los compuestos de la invención de fórmula I, II, III o IV son útiles para tratar enfermedades oftálmicas y mediar la actividad de las proteinquinasas. Más particularmente, los compuestos son útiles como agentes antiangiogénicos y como agentes para modular y/o inhibir la actividad de proteinquinasas, proporcionando de esta manera tratamientos para enfermedades oftálmicas y cáncer u otras enfermedades asociadas con proliferación celular mediadas por proteinquinasas.

El término "alquilo" como se utiliza en esta memoria descriptiva se refiere a grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que tienen entre uno y doce átomos de carbono. Los grupos ejemplares alquilo incluyen metilo (abreviadamente Me), etilo (abreviadamente Et), n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo (abreviadamente t-Bu), pentilo, isopentilo, terc-pentilo, hexilo, isohexilo y similares. El término "alquilo inferior" designa un alquilo que tiene entre 1 y 8 átomos de carbono (un alquilo (C_1 – C_8)). Los alquilos sustituidos adecuados incluyen, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 2-fluoroetilo, 3-fluoropropilo, hidroximetilo, 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo y similares.

El término "alquilideno" se refiere a un radical divalente que tiene entre uno y doce átomos de carbono. Los grupos alquilideno ilustrativos incluyen CH_2, $CHCH_3$, $(CH_3)_2$ y similares.

El término"alquenilo" se refiere a grupos alquenilo de cadena lineal y ramificada que tienen entre dos y doce átomos de carbono. Los grupos alquenilo ilustrativos incluyen prop-2-enilo, but-2-enilo, but-3-enilo, 2-metilprop-2-enilo, hex-2-enilo y similares.

El término "alquinilo" se refiere a grupos alquinilo de cadena lineal o ramificada que tienen entre dos y doce átomos de carbono.

El término"cicloalquilo" se refiere a carbociclos saturados o parcialmente insaturados que tienen entre tres y doce átomos de carbono, que incluyen estructuras cicloalquilo bicíclicas y tricíclicas. Los cicloalquilos adecuados incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares.

Un grupo "heterocicloalquilo" tiene la intención de significar un radical monocíclico saturado o parcialmente insaturado que contiene átomos de

carbono, preferiblemente 4 ó 5 átomos de carbono en el anillo y al menos un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno y azufre.

Los términos "arilo" y "heteroarilo" se refieren a estructuras de anillo aromático o insaturado monocíclico y policíclico, con "arilo" refiriéndose a los que son carbociclos y "heteroarilo" refiriéndose a los que son heterociclos. Los ejemplos de estructuras de anillos aromáticos incluyen fenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, furilo, tienilo, pirrolilo, piridinilo, pirazolilo, imidazolilo, pirazinilo, piridazinilo, 1,2,3-triazinilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1-H-tetrazol-5-ilo, indolilo, quinolinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo (tianaftenilo) y similares. Dichos restos se pueden sustituir opcionalmente mediante una estructura de anillo condensado o puente, por ejemplo OCH_2-O.

El término "alcoxi" tiene la intención de significar el radical –O–alquilo. Los ejemplos ilustrativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi y similares.

El término "ariloxi" representa –O–arilo, en el que arilo se ha definido anteriormente.

El término "cicloalcoxilo" representa –O–cicloalquilo, en el que cicloalquilo se ha definido anteriormente.

El término "halógeno" representa cloro, flúor, bromo o yodo. El término "halo" representa cloro, fluoro, bromo o yodo.

En general, los diversos restos o grupos funcionales para variables en las fórmulas se pueden sustituir opcionalmente por uno o más sustituyentes adecuados. Los sustituyentes ejemplares incluyen un halógeno (F, Cl, Br o I), alquilo inferior, -OH, -NO_2, -CN, -CO_2H, -O-alquiloinferior, -arilo, -aril-alquilo inferior, -CO_2CH_3, -$CONH_2$, -OCH_2CONH_2, -NH_2, -SO_2NH_2, haloalquilo (por ejemplo, -CF_3, -CH_2CF_3), -O-haloalquilo (por ejemplo, -OCF_3, -$OCHF_2$) y

similares.

Los términos "comprendiendo" e "incluyendo" se usan en un sentido abierto, no limitante.

Se entiende que aunque un compuesto de fórmula I puede mostrar el fenómeno de tautomería, los dibujos de las fórmulas dentro de esta memoria descriptiva describen expresamente solamente una de las posibles formas tautómeras. Por lo tanto se entiende que en la invención las fórmulas se intenta que representen cualquier forma tautómera del compuesto descrito y no se limita meramente a una forma tautómera específica descrita por los dibujos de las fórmulas.

Algunos de los compuestos de la invención pueden existir en forma de estereoisómeros únicos (es decir, esencialmente exentos de otros estereoisómeros), racematos, y/o mezclas de enantiómeros y/o diastereoisómeros. Todos estos estereoisómeros únicos, racematos y mezclas de los mismos se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención. Preferiblemente, los compuestos de la invención que son óptimamente activos se usan en forma ópticamente pura.

Como generalmente entienden los expertos en la técnica, un compuesto ópticamente puro que tiene un centro quiral es uno que consiste esencialmente en uno de los dos posibles enantiómeros (es decir, es enantioméricamente puro) y un compuesto ópticamente puro que tiene más de un centro quiral es uno que es tanto diastereoméricamente puro como enantioméricamente puro. Preferiblemente, los compuestos de la presente invención se usan en una forma que es al menos 90% ópticamente pura, es decir, una forma que contiene al menos 90% de un sólo isómero (80% de exceso enatiomérico

(abreviadamente "e. e" o exceso diastereomérico (abreviadamente en inglés "d. e.")), más preferiblemente al menos 95% (90% de e. e. o d. e.), incluso más preferiblemente al menos 97,5% (95% de e. e. o d. e.), y más preferiblemente al menos 99% (98% de e. e. o d. e.).

Adicionalmente, las fórmulas tienen la intención de cubrir tanto formas solvatadas como no solvatadas de las estructuras identificadas. Por ejemplo, la fórmula I incluye compuestos de la estructura indicada en formas tanto hidratadas como no hidratadas. Otros ejemplos de solvatos incluyen las estructuras en combinación con isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético o etanolamina.

Además de los compuestos de la fórmula I, II, III y IV, la invención incluye profármacos farmacéuticamente aceptables, metabolitos farmacéuticamente activos y sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

"Un profármaco farmacéuticamente aceptable" es un compuesto que se puede convertir en condiciones fisiológicas o mediante solvólisis en el compuesto especificado o en una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto.

"Un metabolito farmacéuticamente activo" tiene la intención de significar un producto farmacológicamente activo producido mediante metabolismo en el cuerpo de un compuesto especificado o sal de los mismos.

Los metabolitos de un compuesto se pueden identificar usando técnicas habituales conocidas en la técnica y sus actividades determinadas usando ensayos tales como los descritos en esta memoria descriptiva.

Los profármacos y metabolitos activos de un compuesto se pueden

identificar usando técnicas habituales conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Bertolini, G. y col., *J. Med. Chem.*, 40, 2011 – 2016 (1997); Shan, D. y col., *J. Pharm. Sci.*, 86 (7), 765 – 767; Bagshawe K., *Drug Dev. Res.*, 34, 220 – 230 (1995); Bodor, N., *Advances in Drug Res.*, 13, 224 – 331 (1984); Bundgaard, H., *Design of Prodrugs* (Elsevier Press 1985); y Larsen, I. K., *Design and Application of Prodrugs*, Drug design and Development (Krogsgaard – Larsen y col., eds., Harwood Academic Publishers, 1991).

Una "sal farmacéuticamente aceptable" tiene la intención de significar una sal que retiene la eficacia biológica de los ácidos y bases libres del compuesto especificado y que no es biológicamente o de otra manera no deseable. Un compuesto de la invención puede poseer un grupo funcional suficientemente ácido, suficientemente básico o ambos, y por consiguiente reaccionar con cualquiera de un número de bases inorgánicas u orgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen las sales preparadas mediante la reacción de los compuestos de la presente invención con un ácido mineral u orgánico o una base inorgánica, tales como las sales que incluyen sulfatos, pirosulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, fosfatos monoácidos, fosfatos diácidos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formiatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butino-1,4-dioatos, hexino-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, xilenosulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos,

γ-hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos, metanosulfonatos, propanosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos y mandelatos.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquiera de los procedimientos disponibles en la técnica, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido alfa-hidroxi, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico o similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de las sales adecuadas incluyen sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

En el caso en que los agentes sean sólidos, los expertos en la técnica

entienden que los compuestos y sales de la invención pueden existir en diferentes formas cristalinas o polimórficas, todas los cuales se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención y fórmulas especificadas.

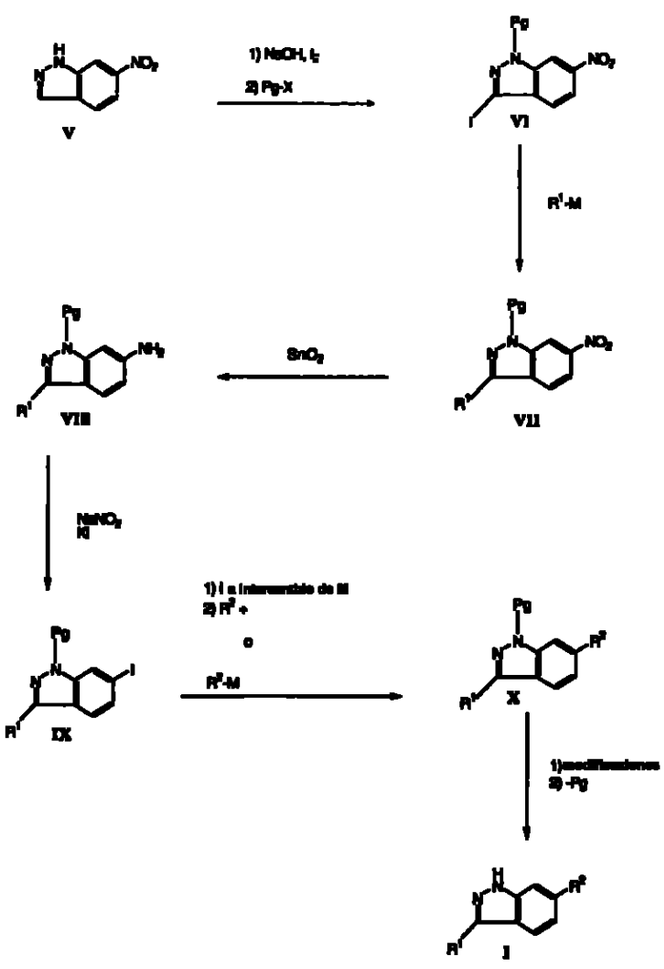
Las cantidades terapéuticamente eficaces de los agentes de la invención se pueden usar para tratar enfermedades mediadas por modulación o regulación de proteinquinasas. Una "cantidad eficaz" tiene la intención de significar la cantidad de un agente que, cuando se administra a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento, es suficiente para efectuar el tratamiento de una enfermedad mediada por la actividad de una o más proteinquinasas, tales como tirosinaquinasas. De este modo, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, sal, metabolito activo o profármaco del mismo es una cantidad suficiente para modular, regular o inhibir la actividad de una o más proteinquinasas de manera que un estado de enfermedad que se media mediante esa actividad se reduce o se alivia.

La cantidad de un agente dado que corresponderá a dicha cantidad variará dependiendo de factores tales como el compuesto particular, estado de la enfermedad y su gravedad, la identidad (por ejemplo, peso) del mamífero en necesidad de tratamiento, pero puede independientemente determinarse rutinariamente por un experto en la técnica. "Tratamiento" tiene la intención de significar al menos la mitigación de una afección de la enfermedad en un mamífero, tal como un ser humano, que está afectado, al menos en parte, por la actividad de una o más proteinquinasas, tal como tirosinaquinasas e incluye: la prevención de que la afección de la enfermedad se produzca en un mamífero, particularmente cuando se encuentra que el mamífero está predispuesto para tener la afección de la enfermedad pero todavía no se ha

diagnosticado que la tiene; modulando y/o inhibiendo la afección de la enfermedad; y/o aliviando el estado de la enfermedad.

Los agentes de la invención se pueden preparar usando las vías de reacción y esquemas de síntesis como se describen más adelante, empleando técnicas disponibles en la técnica usando los materiales de partida que están fácilmente disponibles.

En un procedimiento general de síntesis, los compuestos de fórmula I se prparan según el siguiente esquema de reacción:



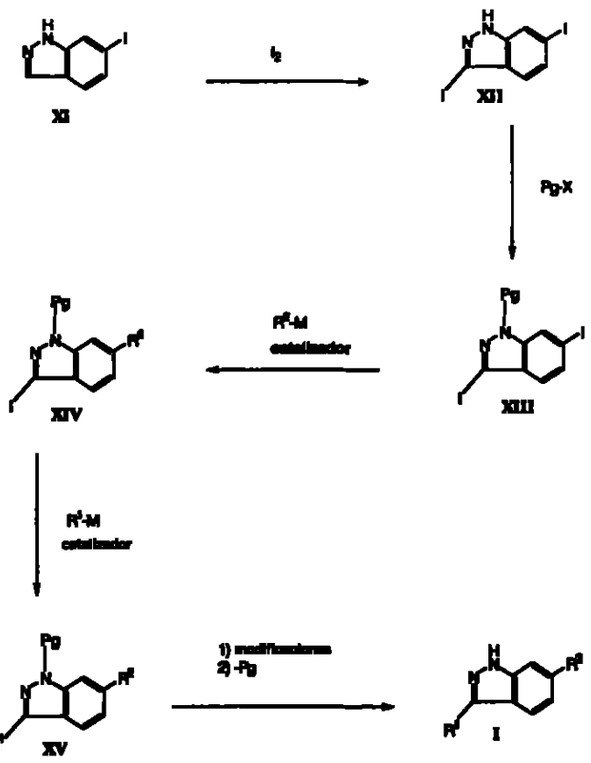
6-Nitroindazol (compuesto V) se trata con yodo y base, por ejemplo, NaOH, en una mezcla acuosa/orgánica, preferiblemente con dioxano. La mezcla se acidifica y el producto se aísla mediante filtración. Al 3-yodo-6-nitroindazol resultante en diclorometano - KOH acuoso al 50% a 0ºC se añade un reactivo del grupo protector (abreviadamente "Pg") (en el que X = halo), preferiblemente cloruro de trimetilsililetoximetilo (abreviadamente en inglés SEM-Cl), y un catalizador de transferencia de fases, por ejemplo, bromuro de tetrabutilamonio (abreviadamente TBABr). Después de 1 – 4 horas, las dos fases se diluyen, se separan los productos orgánicos, se secan con sulfato sódico, se filtran y se concentran. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar compuestos de fórmula VI. El tratamiento de los compuestos de fórmula VI en un disolvente orgánico adecuado con un reactivo R^1-organometálico, preferiblemente un ácido R^1-borónico, en presencia de una base acuosa, por ejemplo, carbonato sódico y un catalizador adecuado, preferiblemente $Pd(PPh_3)_4$ proporciona, después de un tratamiento extractivo y cromatografía en gel de sílice, los compuestos de fórmula VII. El sustituyente R^1 se puede intercambiar en compuestos de fórmula VII o intermedios posteriores durante este esquema mediante escisión oxidante (por ejemplo, ozonólisis) seguido de adiciones a la funcionalidad aldehído resultante con transformaciones de Wittig o de condensación (tipificados en el ejemplo 42 (a-e)). El tratamiento de los compuestos de fórmula VII con un agente reductor, preferiblemente $SnCl_2$, proporciona después de tratamiento acuoso convencional y purificación, compuestos de fórmula VIII. Para la serie de derivados en los que Y = NH o N-alquilo inferior, los compuestos de fórmula VIII se pueden tratar con cloruros, bromuros, yoduros o trifiatos de arilo o

heteroarilo en presencia de una base, preferiblemente Cs_2CO_3, y un catalizador, preferiblemente Pd-BINAP, (y donde Y = N-alquilo inferior, con una etapa posterior de alquilación) para proporcionar compuestos de fórmula X. Para producir otros enlaces Y, se añade nitrito sódico a los compuestos de fórmula VIII en condiciones ácidas acuosas frías habituales seguido de la adición de yoduro potásico y calentamiento suave. El tratamiento y purificación habitual produce compuestos de yodo de fórmula IX.

El tratamiento de los compuestos de fórmula IX con un reactivo organometálico, por ejemplo butillitio, promueve intercambio de halógeno litio. Después este intermedio reacciona con un electrófilo R^2, por ejemplo, un carbonilo o triflato, mediante la posible mediación de metales adicionales y catalizadores, preferiblemente cloruro de cinc y $Pd(PPh_3)_4$ para proporcionar los compuestos de fórmula X. Alternativamente, los compuestos de fórmula IX se pueden tratar con un reactivo organometálico tal como ácido organobórico en presencia de un catalizador, por ejemplo, $Pd(PPh_3)_4$, en una atmósfera de monóxido de carbono para proporcionar los compuestos de fórmula X. Alternativamente, para derivados donde Y = NH o S, los compuestos de fórmula IX se pueden tratar con aminas adecuadas o tioles en presencia de una base, preferiblemente Cs_2CO_3 o K_3PO_4 y un catalizador, preferiblemente Pd-BINAP o Pd-(bis-ciclohexil)bifenilfosfina para proporcionar los compuestos de fórmula X. Después se pueden emplear intercambios de grupos funcionales, tales como oxidaciones, reducciones, alquilaciones, acilaciones, condensaciones y desprotecciones para derivatizar posteriormente estas series proporcionando los compuestos finales de fórmula I.

Los compuestos de la invención de fórmula I se pueden también

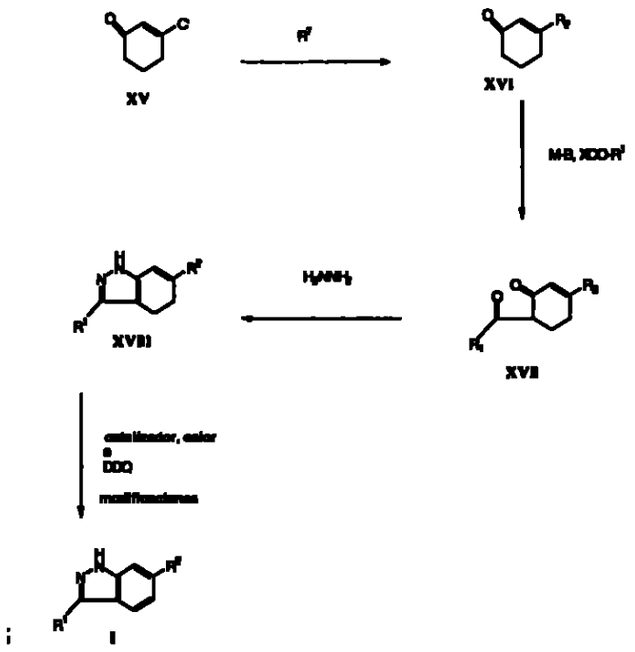
preparar según el procedimiento general mostrado en el siguiente esquema:



6-yodoindazol (XI) se trata con yodo y base, por ejemplo, NaOH, en una mezcla acuosa/orgánica, preferiblemente con dioxano. La mezcla se acidifica y el producto XII se aísla mediante filtración. Al 3,6-diyodoindazol resultante en diclorometano - KOH acuoso al 50% a 0ºC se añade un reactivo del grupo protector, preferiblemente SEM-Cl, y un catalizador de transferencia de fases, por ejemplo, TBABr. Se diluyen las dos fases, se separan los productos orgánicos, se secan con sulfato sódico, se filtran y se concentran. El producto

bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar compuestos de fórmula XIII. El tratamiento de los compuestos de fórmula XIII en un disolvente orgánico adecuado con un reactivo R^2-organometálico adecuado, por ejemplo, R^2-ZnCl, o un reactivo de boro de R^2-boro y un catalizador adecuado, preferiblemente $Pd(PPh_3)_4$ proporciona, después de un tratamiento extractivo y cromatografía en gel de sílice, los compuestos de fórmula XIV. El tratamiento de los compuestos de fórmula XIV en un disolvente orgánico adecuado con un reactivo R^1-organometálico adecuado (por ejemplo, reactivo de boro de R^1-boro o R^1-ZnCl) en presencia de una base acuosa, carbonato sódico y un catalizador adecuado, preferiblemente $Pd(PPh_3)_4$ proporciona, después de un tratamiento extractivo y cromatografía en gel de sílice, los compuestos de fórmula XV. Después se pueden emplear intercambios de grupos funcionales convencionales, tales como oxidaciones, reducciones, alquilaciones, acilaciones, condensaciones y desprotecciones para derivatizar esta serie proporcionando los compuestos finales de fórmula I.

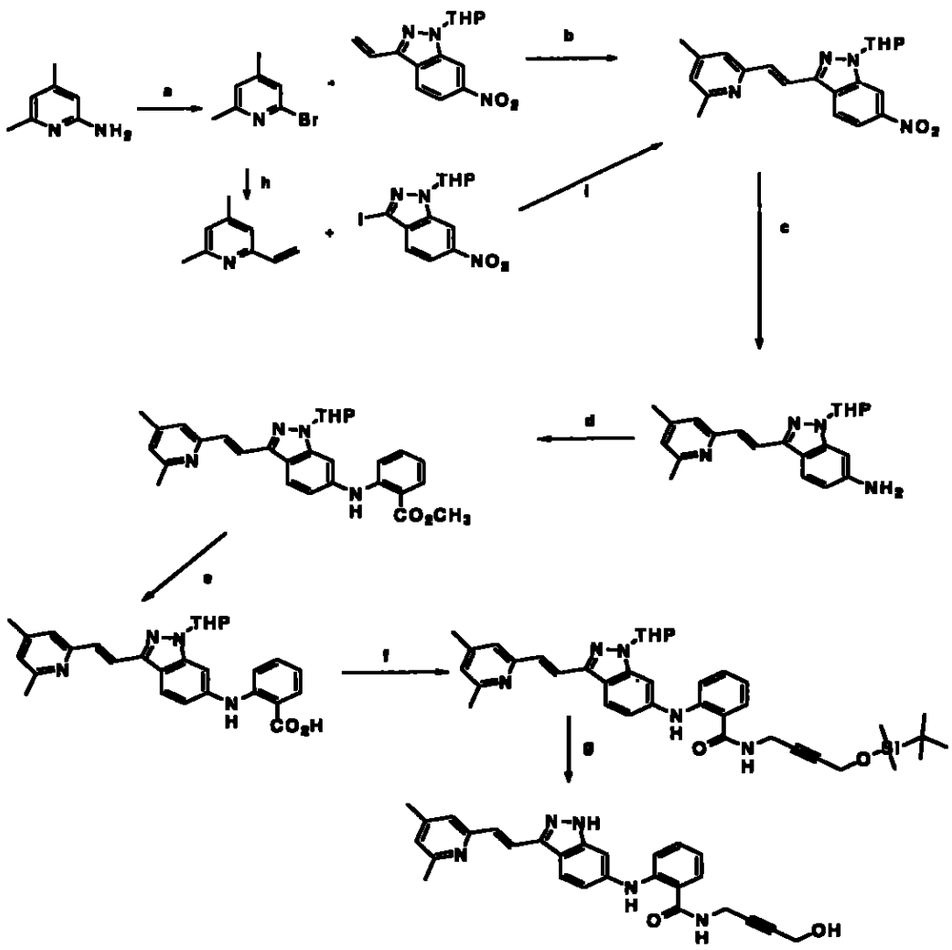
Alternativamente, los compuestos de fórmula I en los que R^2 es un Y-Ar sustituido o no sustituido, en el que Y es O o S se pueden preparar según el esquema general siguiente:



Una solución agitada en acetona de 3-clorociclohex-2-enona (XV), H-R^2, y carbonato potásico anhidro se calienta a reflujo durante 15 – 24 horas, se enfría y se filtra. Concentrando y cromatografiando el filtrado sobre gel de sílice se proporciona 3-R^2-ciclohex-2-enona (XVI).

Las cetonas de fórmula XVI se pueden hacer reaccionar con una base adecuada (M-B), preferiblemente bis(trimetilsilil)amiduro de litio y se hacen reaccionar con R^1-CO-X (donde X = halógeno), que después de tratamiento ácido habitual y purificación proporciona compuestos de fórmula XVII. Este producto, en AcOH/EtOH, combinado con monohidrato de hidracina, se calienta a una temperatura adecuada durante un período de tiempo adecuado,

preferiblemente 60 – 80ºC durante 2 – 4 horas. Después de enfriar, la mezcla se vierte en solución saturada de bicarbonato sódico, se extrae con un disolvente orgánico, se concentra y se purifica sobre gel de sílice para proporcionar compuestos de fórmula XVIII. Los compuestos de fórmula XVIII se pueden oxidar usando una diversidad de procedimientos conocidos para proporcionar los compuestos de fórmula I.



Un procedimiento alternativo para sintetizar los compuestos de la presente invención es el siguiente:

Mediante el cual las condiciones de las etapas a) hasta i) son las siguientes:

a) $NaNO_2$, Br_2, HBr, 0°C - -5°C, rendimiento de 48%;

b) $Pd(OAc)_2$, $Pd(o\text{-}tolil)_3$, diisopropiletilamina (abreviadamente en inglés DIEA), DMF, H_2O, desgasifigado, microondas, 110°C, 1 hora; 68% de rendimiento;

c) Hierro en polvo, NH_4OH acuoso saturado, EtOH, 45°C, 72% de rendimiento;

d) 2-bromobenzoato de metilo, R-BINAP, $Pd_2(dba)_3$, Cs_2CO_3, tolueno, desgasificado, 110°C durante una noche; 74% de rendimiento;

e) KOH, MeOH:THF:H_2O (3:1:1) 70°C, 2 – 3 horas; cuantitativo;

f) Amina protegida, HATU, NEt_3, DMF, temperatura ambiente durante 2 horas; 80% de rendimiento;

g) TsOH (12% de TsOH en AcOH), EtOH (10% acuoso); 44% de rendimiento;

h) Tributilvinilestaño, $Pd(PPh_3)$, 2,6-di-t-butil-4-metilfenol, tolueno, desgasificado, 105°C, 31% de rendimiento;

i) $Pd(OAc)_2$, $Pd(o\text{-}tolil)_3$, DIEA, DMF, desgasificado, 100°C; aproximadamente 70% de rendimiento.

Otros compuestos de fórmula I se pueden preparar de manera análoga a los procedimientos generales descritos anteriormente o los procedimientos detallados descritos en los ejemplos de esta memoria descriptiva. La afinidad

de los compuestos de la invención por un receptor se puede potenciar proporcionando múltiples copias del ligando en proximidad cercana, preferiblemente usando un andamiaje proporcionado por un resto de vehículo. Se ha mostrado que la provisión de tales compuestos de valencia múltiple con un espacio óptimo entre los restos mejora notablemente la unión a un receptor. Véase, por ejemplo, Lee y col., *Biochem*, 23, 4255 (1984). El espacio y la multivalencia se pueden controlar mediante la selección de un resto de vehículo adecuado o unidades de engarce. Dichos restos incluyen soportes moleculares que contienen una multiplicidad de grupos funcionales que se pueden hacer reaccionar con grupos funcionales asociados a los compuestos de la invención. Ciertamente, se pueden usar una diversidad de vehículos, incluyendo proteínas tales como BSA o HSA, una multiplicidad de péptidos incluyendo, por ejemplo, pentapéptidos, decapéptidos, pentadecapéptidos y similares. Los péptidos o proteínas pueden contener el número deseado de restos de aminoácidos que tienen grupos amino libres en sus cadenas laterales; sin embargo, otros grupos funcionales, tales como grupos sulfhidrilo o grupos hidroxilo, también se pueden usar para obtener enlaces estables.

Se desean compuestos que regulan, modulan o inhiben de forma potente la actividad proteinquinasa asociada a receptores VEGF, FGF, complejos de CDK, TEK, CHK1, LCK, FAK y fosforilasaquinasa entre otros, y que inhiben angiogénesis y/o proliferación celular y es una realización preferida de la presente invención. La presente invención se refiere además a procedimientos de modulación o inhibición de la actividad de proteinquinasa, por ejemplo, en tejido de mamíferos, mediante la administración de un agente de la invención. La actividad de los compuestos de la invención como

moduladores de la actividad de proteinquinasa, tales como la actividad de quinasas, se puede medir mediante cualquiera de los procedimientos disponibles por los expertos en la técnica incluyendo los ensayos in vivo y/o in vitro. Entre los ejemplos de ensayos adecuados para las mediciones de actividad se incluyen los descritos en Parast C. y col., *Biochemistry*, 37 16788 – 16801 (1998); Jeffrey y col., *Nature*, 376, 313 – 320 (1995); la publicación internacional WIPO WO 97/34876; y la publicación internacional WIPO WO 96/14843. Estas propiedades se pueden valorar, por ejemplo, usando uno o más de los procedimientos de ensayo biológico establecidos en los ejemplos más adelante.

Los agentes activos de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas como se describe más adelante. Las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenden una cantidad eficaz moduladora, reguladora o inhibidora de un compuesto de fórmula I, II, III o IV y un vehículo o diluyente inerte farmacéuticamente aceptable. En una realización de las composiciones farmacéuticas, se proporcionan niveles eficaces de los agentes de la invención de manera que se proporcionan beneficios terapéuticos que implican modulación de proteinquinasas. Por "niveles eficaces" se entiende niveles en los que los efectos de proteinquinasas están, por lo menos, regulados. Estas composiciones se preparan en forma de dosificación unitaria adecuada para el modo de administración, por ejemplo, administración oral o parenteral.

Un agente de la invención se administra en forma de dosificación convencional preparada mediante la combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente (por ejemplo, un compuesto de fórmula I)

como ingrediente activo con vehículos o diluyentes farmacéuticos adecuados según procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden incluir mezcla, granulación y compresión o disolución de los ingredientes de manera adecuada a la preparación deseada.

El vehículo farmacéutico empleado puede ser sólido o líquido. Los ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Los ejemplos de vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, agua y similares. De manera similar, el vehículo o diluyente puede incluir material de retardo o de liberación con el tiempo conocido en la técnica, tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o con una cera, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metacrilato de metilo y similares.

Se pueden emplear una diversidad de formas farmacéuticas. De ese modo, si se usa un vehículo sólido, la preparación se puede comprimir, situar en una cápsula dura de gelatina en forma de polvo o gránulo o en forma de un trocisco o gragea. La cantidad de vehículo sólido puede variar, pero generalmente estará entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 1 g. Si se usa un vehículo líquido, la preparación estará en forma de jarabe, emulsión, gotas, cápsula blanda de gelatina, solución o suspensión inyectable estéril en una ampolla o vial o suspensión líquida no acuosa.

Para obtener una dosis hidrosoluble estable, se disuelve una sal farmacéuticamente aceptable de un agente de la invención en una solución acuosa de un ácido orgánico o inorgánico, tal como una solución 0,3 M de ácido succínico o ácido cítrico. Si no está disponible una forma de sal soluble, el agente se puede disolver en un codisolvente adecuado o combinaciones de

codisolventes. Los ejemplos de codisolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcohol, propilenglicol, polietilenglicol 300, polisorbato 80, glicerina y similares en concentraciones que varían entre 0 – 60% del volumen total. En una realización ejemplar, un compuesto de fórmula I se disuelve en DMSO y se diluye con agua. La composición también puede estar en la forma de una solución de una forma de sal del ingrediente activo en un vehículo acuoso adecuado tal como agua o solución salina isotónica o solución de dextrosa.

Se apreciará que las dosificaciones reales de los agentes usados en las composiciones de esta invención variarán según el complejo particular que se esté usando, la composición particular formulada, el modo de administración y el sitio en particular, huésped y enfermedad que se está tratando. Las dosificaciones óptimas para un conjunto dado de afecciones se puede averiguar por los expertos en la técnica usando ensayos de determinación de dosificaciones convencionales en vista de los datos experimentales para un agente. Para la administración oral, una dosis diaria ejemplar generalmente empleada está entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, con cursos de tratamiento repetidos a intervalos adecuados. La administración de profármacos se dosifica típicamente a niveles de peso que son químicamente equivalentes a los niveles en peso de la forma totalmente activa.

Las composiciones de la invención se pueden fabricar de modos generalmente conocidos para preparar composiciones farmacéuticas, por ejemplo, usando técnicas convencionales tales como mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, producción de pasta o polvo fino,

emulsificación, encapsulación, envolvimiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables, que se pueden seleccionar de excipientes y auxiliares que facilitan la elaboración de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente.

La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Para inyección, los agentes de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosal, se usan en la formulación los penetrantes adecuados de la barrera a permear. Dichos penetrantes se conocen generalmente bien en la técnica.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen en forma de comprimidos, píldoras, gragea, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener usando un excipiente sólido en mezcla con el ingrediente activo (agente), triturando opcionalmente la mezcla resultante y tratando la mezcla de gránulos después de añadir los productos auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen: cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; y preparaciones de celulosa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo,

almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio o polivinilpirrolidona (abreviadamente PVP).

Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal de los mismos tal como alginato sódico.

Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuadas. Se pueden añadir materias colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de grageas para identificación o caracterización de las diferentes combinaciones de los agentes activos.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con cargas, tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración. Para administración

bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o grageas formuladas de una manera convencional.

Para la administración intranasal o por inhalación, los compuestos para uso según la presente invención se distribuyen convenientemente en forma de una presentación de pulverizador en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para distribuir una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina para uso en un inhalador o insuflador y similares se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como, suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de los agentes activos se pueden preparar en forma de suspensiones de inyecciones oleosas adecuadas. Los disolventes

o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyecciones acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Para la administración ocular, un compuesto de fórmula I, II, III o IV se distribuye en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable de manera que el compuesto se mantiene en contacto con la superficie ocular durante un período de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre la córnea y/o esclerótica y las regiones internas del ojo, incluyendo, por ejemplo, la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/cuerpo ciliar, lente, coroide/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser una pomada, aceite vegetal, o material de encapsulación. Un compuesto de la invención puede también inyectarse directamente en el humor vítreo o en el humor acuoso.

Además, también se puede administrar un compuesto mediante procedimientos aceptables bien conocidos, tales como inyecciones subtenon y/o subconjuntivales. Como se conoce bien en la técnica oftálmica, la mácula se compone principalmente de conos retinales y es la región de máxima agudeza visual en la retina. Una cápsula de Tenon o membrana de Tenon se dispone en la esclerótica. Una conjuntiva 36 cubre un área corta del globo del del ojo hasta posterior (la conjuntiva bulbar) y se pliega hacia arriba (la vía sin

salida superior) o hacia abajo (la vía sin salida inferior) para cubrir las áreas internas del párpado superior y párpado inferior, respectivamente. La conjuntiva se dispone en la parte superior de la cápsula de Tenon.

La esclerótica y cápsula de Tenon definen la superficie exterior del globo del ojo. Para tratamiento de ARMD, CNV, retinopatías, retinitis, uveitis, edema macular cistoide (abreviadamente en inglés CME), glaucoma, y otras enfermedades o afecciones del segmento posterior del ojo, es preferible disponer de un depósito de una cantidad específica de un agente activo oftálmico y farmacéuticamente aceptable directamente en la superficie exterior de la esclerótica y debajo de la cápsula de Tenon. Además, en los casos de ARMD y CME es más preferible disponer del depósito directamente sobre la superficie exterior de la esclerótica, debajo de la cápsula de Tenon, y generalmente encima de la mácula. En un estudio que usa conejos Nueva Zelanda blancos, un depósito de fármaco de 4,9(11)-pregnadien-17.alfa.,21-diol-3,20-diona-21-acetato, un esteroide angiostático disponible de Steraloids, Inc. de Wilton, New Hampshire, se dispuso directamente en la superficie externa de la esclerótica, debajo de la cápsula de Tenon y ligeramente posterior al ecuador de los ojos del conejo. Dicho depósito de fármaco daba como resultado una concentración del esteroide angiostático, promediada en la retina entera y medida el día después de la inyección, aproximadamente diez veces mayor que una concentración similar distribuida mediante un depósito localizado debajo de la conjuntiva pero encima de la cápsula de Tenon de los ojos del conejo. Dado el hecho de que la cápsula de Tenon de un conejo Nueva Zelanda blanco es muy fina, estos resultados beneficiosos son altamente inesperados. Es importante destacar que la cápsula de Tenon del ojo

humano es también muy fina. 4,9(11)Pregnadien-17.alfa.,21-diol-3,20-diona-21-acetato, y el compuesto relativo 4,9(11)-Pregnadien-17-alfa 21-diol-3,20-diona se describen más completamente en las patentes de Estados Unidos Nº 5.770.592 y 5.679.666, que se incorporan en esta memoria descriptiva en su totalidad como referencia.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos, antes de uso. Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de liberación retardada. Estas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante inyección intramuscular de implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) o mediante la inyección subtenon o intravitreal anteriormente mencionadas.

En realizaciones particularmente preferidas de la invención, los compuestos se pueden preparar para administración tópica en solución salina (combinados con cualquiera de los conservantes y agentes antimicrobianos comúnmente usados en preparaciones oculares) y administrarse en forma de gotas para los ojos. La solución o suspensión del factor anti-angiogénico se puede preparar en su forma pura y administrarse varias veces al día. Alternativamente, las composiciones anti-angiogénicas, preparadas como se ha descrito anteriormente, se pueden también administrar directamente a la

córnea.

En realizaciones preferidas, la composición se prepara con un polímero mucoadhesivo que se une a la córnea. De este modo, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados escasamente solubles, por ejemplo, en forma de una sal escasamente soluble. En realizaciones posteriores, los factores anti-angiogénicos o composiciones anti-angiogénicas se pueden utilizar como adjuntos a la terapia esteroide convencional.

Un vehículo farmacéutico para los compuestos hidrófobos es un sistema codisolvente que comprende alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. El sistema codisolvente puede ser un sistema codisolvente de VPD. VPD es una solución al 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del tensioactivo no polar polisorbato 80, y 65% p/v de polietilenglicol 300, preparada hasta un volumen en etanol absoluto. El sistema codisolvente VPD (VPD:5W) contiene VPD diluida 1:1 con un 5% de dextrosa en solución acuosa. Este sistema codisolvente disuelve compuestos hidrófobos bien, y él mismo produce baja toxicidad tras la administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de un sistema codisolvente se pueden variar considerablemente sin destruir su solubilidad y características tóxicas. Además, la identidad de los componentes codisolventes se pueden variar: por ejemplo, otros tensioactivos no polares de baja toxicidad se pueden usar en lugar de polisorbato 80; el tamaño de la fracción de polietilenglicol se puede variar; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, por ejemplo, polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir a la

dextrosa.

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de administración para compuestos farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y emulsiones son ejemplos conocidos de vehículos o excipientes de distribución para fármacos hidrófobos. También se pueden emplear ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque usualmente con el coste de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos se pueden distribuir usando un sistema de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación sostenida y son conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes de fase sólida o de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Algunos de los compuestos de la invención se pueden proporcionar en forma de sales con contraiones farmacéuticamente compatibles. Las sales farmacéuticamente compatibles se pueden formar con muchos ácidos, incluyendo, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros

protónicos que son las formas de base libres correspondientes.

La preparación de los compuestos preferidos de la presente invención se describe en detalle en los siguientes ejemplos, pero el técnico reconocerá que las reacciones químicas descritas se pueden adaptar fácilmente para preparar numerosos otros inhibidores de proteinquinasas de la invención. Por ejemplo, la síntesis de compuestos no ejemplificados según la invención se puede realizar exitosamente mediante modificaciones evidentes para los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante la protección adecuada de grupos que interfieren, mediante el cambio a otros reactivos adecuados conocidos en la técnica, o mediante modificaciones rutinarias de las condiciones de reacción. Alternativamente, se reconocerán otras reacciones descritas en esta memoria descriptiva o conocidas en la técnica que tienen aplicabilidad para la preparación de otros compuestos de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN Y REALIZACIONES PREFERIDAS

EJEMPLOS

En los ejemplos descritos más adelante, salvo que se indique otra cosa todas las temperaturas se exponen en grados Celsius y todas las partes y porcentajes están en peso. Los reactivos se compraron en proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Company o Lancaster Synthesis Ltd. y se usaron sin posterior purificación salvo que se indique otra cosa. Tetrahidrofurano (abreviadamente THF), N,N-dimetilformamida (abreviadamente DMF), diclorometano, tolueno y dioxano se compraron en Aldrich en botellas cerradas herméticamente y seguras y se usaron tal como se recibieron. Todos los disolventes se purificaron usando procedimientos

habituales fácilmente conocidos por los expertos en la técnica, salvo que se indique otra cosa.

Las reacciones expuestas más adelante se hicieron generalmente en una presión positiva de argón o nitrógeno o con tubo de secado, a temperatura ambiente (salvo que se indique otra cosa), en disolventes anhidros, y los matraces de reacción se cerraron con septum de caucho para la introducción de sustratos y reactivos mediante una jeringa. Los artículos de vidrio se secaron horno y/o se secó por calor. La cromatografía analítica en capa fina (abreviadamente en inglés TLC) se realizó sobre placas de gel de sílice sobre vidrio 60 F 254 Analtech (0,25 mm) y se eluyeron con las relaciones de disolventes adecuados (v/v) y se indican cuando es apropiado. Las reacciones se ensayaron mediante TLC y se terminaron según se juzgaba por el consumo del material de partida.

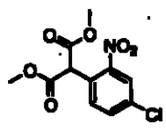
La visualización de las placas de TLC se hizo con un reactivo de pulverización de *p*-anisaldehído o reactivo de ácido fosfomolibdico (Aldrich Chemical 20% en peso en etanol) y se activaron con calor. Los tratamientos se realizaron típicamente duplicando.el volumen de la reacción con el disolvente de reacción o disolvente de extracción y después lavando con las soluciones acuosas indicadas usando 25% en volumen del volumen de extracción salvo que se indique otra cosa. Las soluciones de productos se secaron con Na_2SO_4 anhidro antes de la filtración y la evaporación de los disolventes a presión reducida en un rotavapor y se describieron como disolventes retirados a vacío. La cromatografía ultrarrápida en columna (Still y col., *J. Org. Chem.*, 43, 2923 (1978)) se realizó usando gel de sílice ultrarrápida de calidad Baker (47 – 61 µm) y gel de sílice: la relación de material bruto de aproximadamente 20:1 a

50:1 salvo que se indique otra cosa. La hidrogenolisis se realizó a la presión indicada en los ejemplos o a presión ambiente.

Los espectros de ^{1}H – RMN se registraron en un instrumento Bruker que funcionaba a 300 MHz y los espectros de ^{13}C – RMN se registraron funcionando a 75 MHz. Los espectros de RMN se obtuvieron como soluciones de $CDCl_3$ (indicados en ppm), usando cloroformo como patrón de referencia (7,25 ppm y 77,00 ppm) o CD_3OD (3,4 y 4,8 ppm y 49,3 ppm), o internamente tetrametilsilano (0,00 ppm) cuando fuera adecuado. Otros disolventes de RMN se usaron según fuera necesario. Cuando se describe la multiplicidad de picos, se usan las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete), a (ancho), dd (doblete de dobletes), dt (doblete de tripletes). Las constantes de acoplamiento, cuando se proporcionan, se indican en Hercios (Hz).

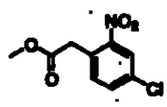
Los espectros de infrarrojos (abreviadamente IR) se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer FT – IR en forma de aceites puros, en forma de gránulos de KBr, o en forma de soluciones de $CDCl_3$, y cuando se proporcionan se indican en números de onda (cm^{-1}) Los espectros de masas se obtuvieron usando LSIMS o electropulverización. Todos los puntos de fusión (abreviadamente p. f.) están sin corregir.

Ejemplo 1(a) Éster dimetílico del ácido 2-(4-cloro-2-nitro-fenil)-malónico



A una suspensión agitada de NaH (36,0 g, 1500 mmol) en NMP (1,0 l) se añadió dimetilmalonato (137,4 ml, 1200 mmol) gota a gota. La reacción se enfrió lo necesario para mantener la temperatura interna por debajo de 30 grados Celsius. Después de que cesará el desprendimiento de gas, se añadió 2,4-dicloronitrobenceno (192 g., 1000 mmol) a la reacción. Se calentó cuidadosamente a 65 grados Celsius hasta que la reacción se completó según se determinó mediante HPLC. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, y después se vertió sobre 500 ml de hielo mezclados con 150 ml de HCl concentrado. El pH de la fase acuosa se ajustó a neutral usando NaOH 1N. Los sólidos se eliminaron mediante filtrado a través de un filtro grueso sinterizado, y se aclararon con agua (3L). Los sólidos amarillos se dejaron secar durante una noche. El rendimiento fue de 261,5 gr, 91%.

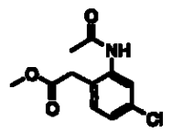
Ejemplo 1(b) Éster metílico del ácido (4-cloro-2-nitro-fenil)-acético



Una disolución de éster dimetílico del ácido 2-(4-cloro-2-nitro-fenil)-malónico (195g, 679,4 mmol) en agua (100 ml) y NMP (1000 ml) se calentaron hasta el reflujo durante 3,5 horas. El disolvente se eliminó mediante evaporación con rotavapor para dar un aceite. El aceite se disolvió en acetato de etilo, y después se lavó con agua (5 x 300 ml). La fase acuosa se extrajo entonces con acetato de etilo (4 x 300 ml). El extracto orgánico se lavó con agua. Las fases orgánicas se combinaron y secaron sobre $MgSO_4$. Después de la eliminación de los sólidos por filtración, el disolvente se evaporó para

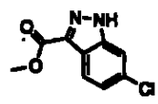
producir el producto deseado como un sólido marrón-anaranjado (160,0 g, 95%).

Ejemplo 1(c) Éster metílico del ácido (2-acetilamino-4-cloro-fenil)-acético



Un matraz lleno de argón se cargó con éster metílico del ácido (4-cloro-2-nitro-fenil)-acético (40 g, 175 mmol), Pd/C 10% (2,5 g), anhídrido acético (64 ml, 677 mmol), agua (9 ml) y ácido acético (150 ml). Al matraz se le inyectó hidrógeno a 30 PSI (206.850 kPa) mediante un sistema de vacío, y se agitó vigorosamente. Después de dos horas, se añadió más Pd/C al 10% (2 g), y se completó la reacción después de un total de 4 horas de tiempo de reacción. El Pd/C al 10% se eliminó por filtración, y el disolvente se eliminó con rotavapor.

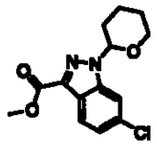
Ejemplo 1(d) Éster metílico del ácido 6-cloro-1H-indazol-3-carboxílico



A una disolución de éster metílico del ácido (2-acetilamino-4-cloro-fenil)-acético (32,0 g, 133 mmol) en ácido acético (200 ml) agitado a 90 grados Celsius se añadió nitrito de *terc*-butilo (20,5 ml, 172,3 mmol) durante una hora. La reacción se vertió en agua (1,4 l) y los sólidos se recuperaron por filtración. El precipitado amarillo se disolvió en acetato de etilo, después se lavó con NaCl

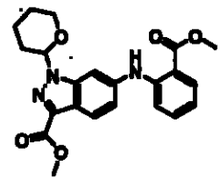
saturado. La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, y se concentró para dar un sólido. Los sólidos se trituraron con hexanos y se filtraron para proporcionar el material deseado (21,63 g, 77%).

Ejemplo 1(e) Éster metílico del ácido 6-cloro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1-H-indazol-3-carboxílico



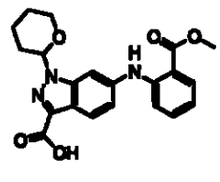
A una suspensión del éster metílico del ácido 6-cloro-1H-indazol-3-carboxílico (8,3 g, 39,5 mmol) en MeCN (200 ml) se añadió 3,4-dihidro-2H-pirano (5,4 ml, 59,3 mmol) y ácido *p*-toluenosulfónico (237 mg, 1,25 mmol). Después de dejar a la reacción agitándose durante 10 minutos, el $NaHCO_3$ saturado (1 ml) se añadió y el disolvente se eliminó con rotavapor hasta un volumen de 100 ml. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua (50 ml) y después con NaCl saturado (50 ml). La fase orgánica se secó entonces sobre Na_2SO_4. Después de que los sólidos se eliminaran por filtración, la fase orgánica se concentró hasta un aceite con rotavapor. El producto se precipitó a partir del aceite usando hexanos para producir el producto deseado (7,667 g, 66% de rendimiento).

Ejemplo 1(f) Éster metílico del ácido 6-(2-metoxicarbonil-fenilamino)-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-3-carboxílico



A una solución del éster metílico de 6-cloro-1-1H-indazol-3-carboxílico (2,94 g, 10,0 mmoles) en 1,2-dimetoxietano (30ml) se le añadió K_3PO_4 (5,32 g, 25,0 mmoles), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (459 mg, 0,05 mmol), 2-(diciclohexilfosfino)bifenilo (701 mg, 2,0 mmol), y antranilato de metilo (2,59 ml, 20,0 mmol). La solución se inundó con argón a vacío tres veces antes de ser calentada a 80° Celsius durante 18 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y los sólidos se retiraron por filtración. Después de lavar los sólidos conacetato de etilo, el disolvente se eliminó con rotavapor. El aceite residual se purificó por cromatografía (150g gel de sílice, AcOEt/Hex del 10-30%) para dar 1,23 g (51%) del producto deseado.

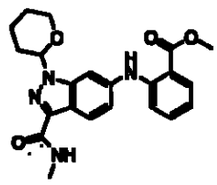
Ejemplo 1(g) ácido 6-(2-metoxicarbonil-fenilamino)-1-(tetrahidro-pirano-2-il)-1H-indazol-3-carboxílico



A una disolución de éster metílico del ácido 6-(2-metoxicarbonil-fenilamino)-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-3-carboxílico (2,05 g, 5 mmol) en

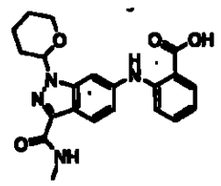
metanol (18 ml) y tetrahidrofurano (8 ml), se añadió una disolución de hidróxido de sodio (0,30 g, 7,5 mmol) en agua (2,7 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se neutralizó con HCl 1 N a un pH de 1. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (25 ml) y agua (25 ml). Después de separarse las fases, la fase acuosa se lavó con CH_2Cl_2 (3 x 25 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaCl saturado (100 ml) y después se secaron sobre Na_2SO_4. Los sólidos se filtraron y el líquido se concentró a un aceite. El producto se criatalizó con acetato de etilo y hexanos para producir el producto deseado (1,616 g, 82%).

Ejemplo 1(h) éster metílico del ácido 2-[3-metilcarbamoil-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazolil-6-amino]-benzoico



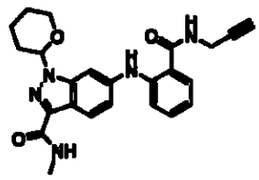
A una disolución de ácido 6-(2-metoxicarbonil-fenilamino)-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-3-carboxílico (0,50 g, 1,27 mmol) en DMF se añadió trietilamina (0,42 ml, 3,04 mmol), metilamina (1,9 ml, 3,81 mmol), y HATU (0,578 g, 1,52 mmol). La reacción se agitó durante tres horas y después se concentró mediante rotavapor. El aceite bruto se cromatografió (50 g de gel de sílice, 25-50% de acetato de etilo/hexanos) para producir el producto deseado (214 mg, 42%).

Ejemplo 1(i) Ácido 2-[3-metilcarbamoil-1-(tetrahidro-2-piranil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



A una disolución de éster metílico del ácido 2-[3-metilcarbamoil-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (0,20 g, 0,49 mmol) en metanol (1,4 ml) y tetrahidrofurano (0,6 ml) se le añadió una disolución de hidróxido de sodio (59 mg, 1,47 mmol) en agua (0,3 ml). La reacción se calentó a 60 grados Celsius durante 1 hora y se enfrió entonces a temperatura ambiente. El pH se ajustó con HCl 2 N a un pH de 2. Se añadieron acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml) y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml) y las fases orgánicas se combinaron. Después de lavar con agua (15 ml), la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4. Los sólidos se filtraron y se retiraron, y la fase orgánica se evaporó para producir un sólido amarillo (193 mg, 100%).

Ejemplo 1(j) Metilamida del ácido 6-(2-prop-2-inilcarbamoil-fenilamino)-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-3-carboxílico

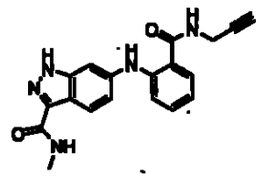


A una disolución de ácido 2-[3-metilcarbamoil-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (150 mg, 0,381 mmol) en DMF (3,6 ml) se le añadió propargilamina (0,052 ml, 0,761 mmol), TEA (0,264 ml, 1,90 mmol) y HATU (217 mg, 0,571 mmol). La reacción se agitó durante 4 horas, y entonces se

diluyó con acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml). Las fases se separaron, y la acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaCl saturado

(15 ml) y entonces se secaron sobre Na_2SO_4. Los sólidos se eliminaron mediante filtración, y el líquido se concentró mediante rotavapor hasta un aceite amarillo (164 mg, 100%).

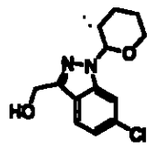
Ejemplo 1(k) Metilamida del ácido 6-(2-propinil-2-inilcarbamoilfenilamino)-1H-indazol-3-carboxílico.



Se disueve la metilamida del ácido 6-(2-prop-2-inilcarbamoil-fenilamino)-1-(tetrahidropiran-2-il)-1H-indazol-3-carboxílico (30 mg) en 1,5 ml de una mezcla 90:10:1 de CH_2Cl_2:TFA:trietil silano y se calienta a reflujo por 2 horas. Se diluye la disolución con tolueno (40 ml) y se concentra con rotavapor a un aceite. Se disuelve el aceite en DMF (1 ml) y se filtra usando un filtro de jeringuilla de 0,2 micrones. Se usa HPLC preparativa para aislar el compuesto deseado (12 mg, 50%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$-d) δ 9,96 (1H, s),8,28(1H, d,J = 8,85 Hz), 7,47 (1H, m), 7,34 (1H, m), 7,22 (1H, m), 7,15 (1H, dd, J_1=8,76 Hz, J2=1,79 Hz), 6,99 (1H,m), 6,86 (1H, t, J=6,97 Hz), 6,31 (1H,m), 4,23 (2H,dd, J1 = 5,18 Hz, J_2 = 2,54 Hz), 3,49 (3H, s), 2,29 (s, 1H).

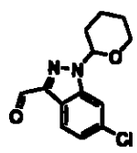
Anal. Calcd. Para $C_{19}H_{17}N_5O_2 \cdot 1{,}0MeOH \cdot 0{,}1$ TFA: C, 62,08; H, 5,44; N, 17,92. Encontrado: C, 61,78; H, 5,45; N, 18,4.

Ejemplo 2(a) [6-cloro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-3-indazolil]-metanol



A una disolución del éster metílico del ácido 6-cloro-1H-indazol-3-carboxílico (2,94 g, 10,0 mmol) en CH_2Cl_2 seco (50 ml) enfriado a –78 grados Celsius se añadió DIBAL-H (3,56 ml, 20 mmol) lentamente. Después de que la adición estuvo completa, se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente, donde HPLC mostró que había un 10% de material inicial remanente. Se añadió después DIBAL-H extra (0,35 ml) y se agitó durante 10 minutos. La reacción se diluyó con acetato de etilo (1000 ml) y se lavó con HCl 1 N (2 x 100 ml). Además, se lavó con $NaHCO_3$ 1 N (100 ml), y entonces con NaCl saturado (100 ml). La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y entonces se concentró a un sólido blanco (2,65 g, 99,5%).

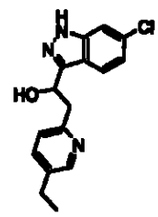
Ejemplo 2(b) 6-cloro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-3-carbaldehído



Una disolución de [6-cloro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-3-indazolil]-metanol (1,75 g, 6,58 mmol), IBX (2,76 g, 9,87 mmol) y DMSO (27 ml) se dejó agitando durante una noche. La reacción se diluyó en acetato de etilo y agua. Las fases se separaron, y la acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml).

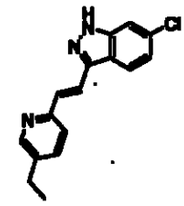
Los extractos orgánicos se combinaron y lavaron con una disolución saturada de NaCl (100 ml). La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y después se concentró en un sólido. El sólido se disolvió en CH_2Cl_2, y se filtró. La fase orgánica se evaporó para producir el producto deseado (1,707 g, 92%).

Ejemplo 2(c) 1-(6-cloro-1H-3-indazolil)-2-(5-etil-piridin-2-il)-etanol



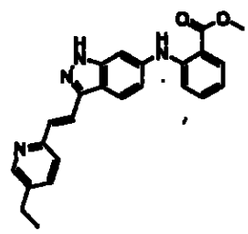
A una disolución agitada de 4-etil-2-metilpiridina (0,458 g, 3,79 mmol) en THF (4 ml) a –50 grados Celsius, se le añade lentamente una disolución de butillitio (1,5 ml, 2,5 M, 3,79 mmol) y se agita durante 10 minutos. A la reacción, se le añade lentamente una disolución de 6-cloro-1H-indazol-3-carbaldehído (0,5 g, 1,89 mmol) en THF (4 ml). Después de agitar durante 10 munitos, la reacción se desactivó con ácido cítrico 1 N (10 ml). La mezcla se diluyó con acetato de etilo (50 ml), agua (20 ml), y una disolución saturada de NaCl (10 ml). Las fases se separaron, y la acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y lavaron con una disolución saturada de NaCl (20 ml). Después de secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4, los sólidos se eliminaron por filtración y los líquidos se concentraron a un aceite mediante rotavapor. La cromatografía (40 g de gel de sílice, 60-100% de acetato de etilo/hexanos) produjo el producto deseado (142 mg, 32%) y recuperó 6-cloro-1H-indazol-3-carbaldehído (348 mg).

Ejemplo 2(d) 6-cloro-3-[2-(5-etil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol



A una disolución agitada de 1-(6-cloro-1H-3-indazolil)-2-(5-etil-2-piridinil)-etanol (232 mg, 0,60 mmol) en CH_2Cl_2 se le añadió TEA (0,25 ml, 1,81 mmol) y cloruro de mesilo (0,070 ml, 0,90 mmol). La reacción se agitó durante 30 minutos, y después se añadió DBU (2 ml). La reacción se calentó a reflujo durante 18 horas, y entonces se desactivó con 40 ml de ácido cítrico 1 N. Las fases se separaron, y la acuosa se extrajo con 20 ml de CH_2Cl_2. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron, y se concentraron con rotavapor. La purificación por cromatografía (12 g de gel de sílice, 50 –70% de acetato de etilo/hexanos) produjo el compuesto deseado (135 mg, 71%).

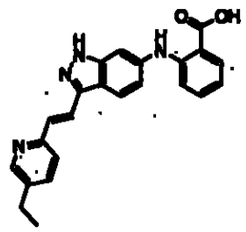
Ejemplo 2(e) Éster metílico del ácido 2-{3-[2-(5-etil-2-piridinil)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzoico



Se añadió 1,2-dimetoximetano (2 ml) a 6-cloro-3-[2-(5-etil-piridin-2-il)-

vinil]-1H-indazol (130 mg, 0,354 mmol), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (16 mg, 0,018 mmol), -(diciclohexilfosfino)bifenilo (25 mg, 0,071 mmol), K_3PO_4 (0,188 g, 0,885 mmol), y antranilato de metilo (0,092 ml, 0,71 mmol). Se hizo el vacío inyectando argón en la reacción (4x) y después se calentó a 80° C durante 19 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo (20 ml) y se filtró a través de un lecho de gel de sílice. Después de lavar con acetato de etilo (50 ml), el disolvente se eliminó mediante rotavapor. El aceite bruto se purificó por cromatografía (40 g de gel de sílice, 30-40% acetato de etilo/hexanos) para producir el producto deseado (54 mg, 32%).

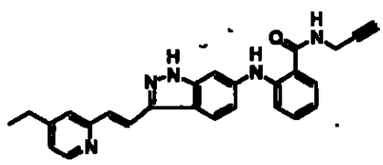
Ejemplo 2(f) Ácido 2-{3-[2-(5-etil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzoico



A una disolución de éster metílico del ácido 2-{3-[2-(5-etilpiridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzoico (50 mg, 0,104 mmol) en metanol (0,42 ml) y THF (0,10 ml) se añadió una disolución de hidróxido de sodio (12 mg, 0,311 mmol) en agua (0,05 ml). La disolución se calentó a 60 grados Celsius durante 3,5 horas y entonces se neutralizó con disolución saturada de NH_4Cl. La reacción se diluyó con agua (20 ml), y entonces se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). Los extractos combinados se secaron primero sobre Na_2SO_4, y entonces los sólidos se eliminaron por filtración. El producto deseado (48,7 mg,

100%) se recuperó después de la evaporación con rotavapor para eliminar los disolventes.

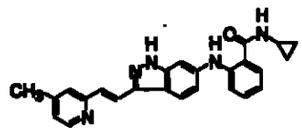
Ejemplo 2(g) 2-{3-[2-(5-etil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-N-prop-2-inil-benzamida



Al ácido 2-{3-[2-(5-etil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzoico (49 mg, 0,105 mmol) se le añadieron 2 ml de una mezcla 90:10:1 de CH_2Cl_2:TFA:TES. La reacción se agitó en condiciones de reflujo durante 1 hora, y entonces se diluyó con tolueno (20 ml). El disolvente se eliminó mediante rotavapor para producir un aceite espeso. El aceite se disolvió en DMF (1 ml) y a esta disolución se añadió TEA (0,072 ml, 0,52 mmol), propargilamina (0,014 ml, 0,208 mmol), y HATU (59 mg, 0,156 mmol). La reacción se agitó durante tres horas, y entonces se purificó mediante HPLC preparatoria para producir el producto deseado (29 mg, 66%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$-d): δ 9,83 (1H, s), 8,63 (2H, s), 8,04 (2H, m), 7,68 (2H, s), 7,47 (1H, m), 7,32 (1H, d, J = 1,51 Hz), 7,10 (1H, dd, J1 = 8,67 Hz, J2 = 1,88 Hz), 6,93 (1H, m), 6,07 (2H, dd, J1 = 5,09 Hz, J2 = 2,26 Hz), 3,15 (1H, t, J = 2,35 Hz), 2,97 (2H, s), 2,74 (1H, s), 2,29 (1H, s), 1,27 (3H, t, J = 7,44 Hz)

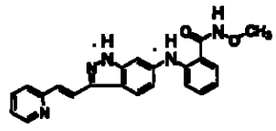
Anal. Calcd. para $C_{28}H_{23}N_5O \cdot 0,3\ H_2O \cdot 1,2$ TFA: C, 60,51; H, 4,43; N, 12,42. Se hallaron: C, 60,38; H, 4,73; N, 12,44.

Ejemplo 2(h) N-ciclopropil-2-{3-[(E)-2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzamida



El compuesto título se preparó análogamente a 2-{3-[2-(5-etil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-N-prop-2-inil-benzamida descrita anteriormente en este documento, sustituyendo 4-etil-2-metilpiridina por 2,4-dimetilpiridina en la etapa donde se preparó 1-(6-cloro-1H-indazol-3-il)-2-(5-etil-piridin-2-il)-etanol, y usando ciclopropilamina en lugar de propargilamina en la etapa final de la secuencia. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9,85 (1H, s), 8,56 (2H, m), 8,20 (3H, m), 7,53 (5H, m), 7,35 (1H, s), 7,2 (1H, d, J = 6,5 Hz), 7,0 (1H, s), 2,83 (1H, m), 0,70 (2H, m), 0,56 (2H, m). ESIMS ($M+H^+$): 410,3.

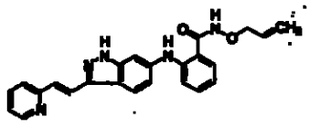
Ejemplo 3(a) N-metoxi-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), clorhidrato de O-metilhidroxilamina (15 mg, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 21,6 mg (67%) del compuesto título como un sólido amarillo. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9,23

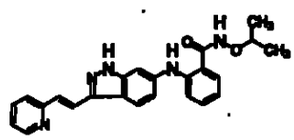
(1H, s), 8,71(1H, d, *J* = 2,2), 8,05 (4H, m), 7,51 (5H, m), 7,25 (1H, s), 7,10 (1H, d, J = 7,7 Hz), 6,91 (1H, m), 5,98 (1H, m), 4,31 (1H, d, J = 14,3), 7,20 (1H, d, J = 7,3), 4,42 (2H, d, J = 3,2). ESIMS ($M+H^+$): 412,1.

Ejemplo 3(b) N-alliloxi-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), clorhidrato de O-alil-hidroxilamina (18.3 mg, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 25,5 mg (74%) del compuesto título como un sólido amarillo. ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 9,28 (1H, s), 8,67 (2H, d, *J* = 3,4), 8,05 (4H, m), 7,48 (5H, m), 7,23 (1H, s), 7,04 (1H, d, J = 7,6 Hz), 6,91 (1H, m), 3,69 (3H, s). ESIMS ($M+H^+$): 386,1.

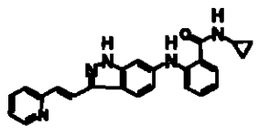
Ejemplo 3 (c) N-isopropoxi-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), clorhidrato de O-isopropil-hidroxilamina (18,7

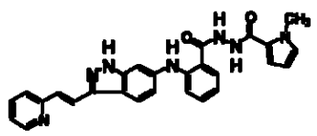
mg, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 17,4 mg (50%) del compuesto título como un sólido amarillo. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9,23 , (1H, s), 8,69 (H, d, *J* = 2,1), 8,03 (4H, m), 7,50 (5H, m), 7,23 (1H, s), 7,04 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,92 (1H, m), 5,98 (1H, m), 4,13 (1H, m), 1,29 (6H, d, J = 8,1). ESIMS ($M+H^+$): 414,1.

Ejemplo 3(d) N-ciclopropil-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



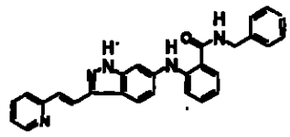
Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), ciclopropilamina (11,6 µl, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,25 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 11,7 mg (35%) del compuesto título como un sólido amarillo. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 9,81 1H, s), 8,68 (1H, d, J = 1,7), 8,51 (1H, s), 8,01 (4H, m), 7,50 (5H, m), 7,24 (1H, s), 7,03 (1H, d, J = 5,3), 6,89 (1H, t, J=4,2), 2,84 (1H,m), 0,72 (2H, m), 0,56 (2H, m). ESIMS ($M+H^+$): 396,1.

Ejemplo 3(f) N'-(1-{2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-fenil}-metanoil)-hidrazida del ácido 1-metil-1H-pirrol-2-carboxílico



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), hidrazida del ácido 1-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (23,3 mg, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 16,1 mg (40%) del compuesto título como un sólido amarillo. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 10,39 (1H, s), 10,00 (1H, s), 9,52 (1H, s), 8,67 (1H, d, *J* = 2,4), 8,07 (4H, m), 7,77 (1H, d, J = 5,2), 7,51 (4H, m), 7,32 (1H, s), 7.09 (1H, d, J = 6,3), 6,98 (3H, m), 6,13 (1H, m), 3,87 (3H, s). ESIMS ($M+H^+$): 478,1.

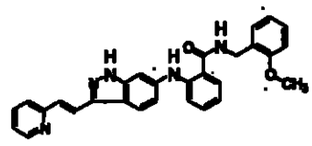
Ejemplo 3(g) N-bencil-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), bencilamina (18,2 µl, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 45,2 mg (76%) del compuesto título como una sal de TFA (1,5 H_2O, 2,1 TFA, peso molecular efectivo = 711,98). ^{1}H NMR (DMSO- d_6): δ 9,86 (1H, s), 9,14 (1H, t, J = 5,4), 8,73 (1H, d, J

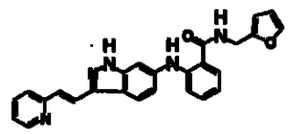
= 4,8), 8,29 (4H, m), 7,56 (1H, d, J = 7,0), 7,74 (2H, m), 7,89 (2H, m), 7,31 (5H, m), 7,16 (1H, d, J = 7,8), 6,93 (1H, t, J = 7,3), 4,46 (2H, d, J = 6,1). ESIMS ($M+H^+$): 446,5.

Ejemplo 3(h) N-(2-metoxi-bencil)-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), *o*-metoxibencilamina (21,8 µl, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 46 mg (81%) del compuesto título como una sal de TFA (1,5 H_2O, 1,5 TFA, peso molecular efectivo = 673,59). ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9,83 (1H, s), 9,03 (1H, t, J = 3,4), 8,70 (1H, d, J = 3,7), 8,08 (4H, m), 7,82 (1H, d, J = 7,4), 7,49 (4H, m), 7,21 (3H, m), 6,96 (4H, m), 4,48 (2H, d, J = 6,3). ESIMS ($M+H^+$): 476,1.

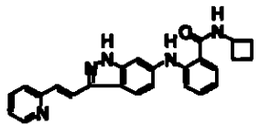
Ejemplo 3(i) N-furan-2-ilmetil-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ylamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-

benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), C-furan-2-il-metilamina (19 µl, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 45 mg (85%) del compuesto título como una sal de TFA (1,5 H_2O, 1,5 TFA, peso molecular efectivo = 633,52). ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9,82 (1H, s), 9,05 (1H, t, J = 2,6), 8,73 (1H, d, J = 3,7), 8,13 (4H, m), 7,73 (1H, d, J = 6,8), 7,57 (2H, m), 7,26 (1H, s), 7,03 (1H, d, J = 7,5), 6,40 (1H, m), 6,28 (1H, m), 4,48 (2H, d, J = 6,5). ESIMS ($M+H^+$): 436,1.

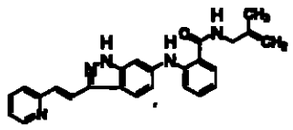
Ejemplo 3(j) N-ciclobutil-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), ciclobutilamina (18,2 µl, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 43,2 mg (92%) del compuesto título como una sal de TFA (1,5 H_2O, 1,1 TFA, peso molecular efectivo = 561,92). ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9,78 (1H, s), 8,72 (2H, m), 8,13 (4H, m), 7,70 (1H, d, J = 7,1), 7,58 (2H, m), 7,41 (2H, m), 7,27 (1H, s), 6,89 (1H, t, J = 4,2), 2,84 (1H, m), 0,72 (2H, m), 0,56 (2H, m). ESIMS ($M+H^+$): 396,1.

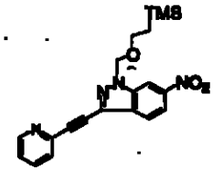
Ejemplo 3(k) N-(2-metil-allil)-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-

ilamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (50,0 mg, 0,084 mmol), 2-metil-alilamina (16,4 µl, 0,17 mmol), trietilamina (58 µl, 0,42 mmol), disuelta en DMF (0,8 ml), se trató con HATU (48 mg, 0,13 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa produciéndose 45 mg (91%) del compuesto título como una sal de TFA (1,6 H_2O, 1,3 TFA, peso molecular efectivo = 586,53). ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9,78 (1H, s), 8,72 (2H, m), 8,13 (4H, m), 7,70 (1H, d, J = 7,1), 7,58 (2H, m), 7,41 (2H, m), 7,27 (1H, s), 7,06 (1H, d, J = 7,1), 6,91 (1H, t, J = 7,5), 4,42 (1H, m), 2,22 (2H, m), 2,08 (2H, m), 1,68 (2H, m). ESIMS ($M+H^+$): 410,1.

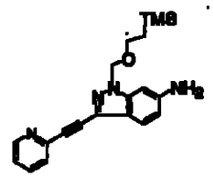
Ejemplo 3(l) 6-nitro-3-piridin-2-iletinil-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol



Una mezcla de 3-yodo-6-nitro-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol (838 mg, 2,0 mmol), 2-etinil-piridina (242 µl, 2,4 mmol), y trietilamina (6,0 ml), se desgasificaron y se inundaron al vacío con atmósfera de argón, después se

trataron con CuI (8 mg, 0,042 mmol), y $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (16 mg, 0,023 mmol). La mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente, al tiempo que HPLC indicó que todo el material de partida se había consumido. La mezcla se purificó mediante la eliminación de los volátiles a alto vacío, pasando después el residuo a través de un lecho de sílice eluido con acetato de etilo. El producto resultante se usó en el paso siguiente sin más purificación. ESIMS ($M+H^+$): 395,1.

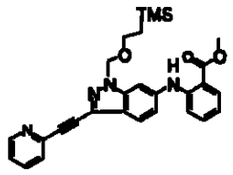
Ejemplo 3(m) 3-piridina-2-iletinil-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamina



Una mezcla de 6-nitro-3-piridin-2-iletinil-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol (2 mmol), $SnCl_2$ (1,37 g, 6,0 mmol), agua (0,5 ml), y MeOH (10 ml), se agitaron en un baño de aceite a 60 grados durante 30 minutos al tiempo que HPLC indicó la reducción completa. A la mezcla resultante se le quitó el metanol por destilación, se suspendió en acetato de etilo (50 ml) y se diluyó con 1M de NaOH (18 ml). La emulsión resultante se extrajo con cuidado con acetato de etilo (10 x 25 ml). Los extractos orgánicos combinados se extrajeron con 1 M de Na_2CO_3, salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$, se concentraron y filtraron a través de un lecho de sílice eluídos con acetato de etilo. El rendimiento del producto bruto para las dos etapas fue de 701 mg, 96% de masa recobrada. ESIMS ($M+H^+$): 365,1.

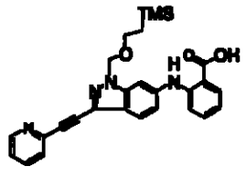
Ejemplo 3(n) Metil éster del ácido 2-[3-piridina-2-iletinil-1-(2-trimetilsilanil-

etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



Una mezcla de 3-piridin-2-iletinil-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamina (560 mg, 1,54 mmol), 2-bromometilbenzoato (647,5 µl, 4,61 mmol), bifenil-2-il-diciclohexil-fosfano (107,8 mg, 0,308 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (70,5 mg, 0,0768 mmol), K_3PO_4 (816 mg, 3,844 mmol), y dimetoxietano (1,7 ml), fue inundada al vacío con atmósfera de nitrógeno, calentándose entonces en un baño de aceite a 70 grados Celsius durante 24 horas. La mezcla negra se diluyó con cloruro de metileno, y se filtró, concentró y cromatografió (20% a 40% acetato de etilo/hexanos). La producción de aceite amarillo/naranja fue de 260 mg, 35% de rendimiento para las tres etapas.

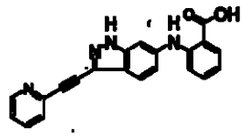
Ejemplo 3(o) Ácido 2-[3-piridin-2-iletinil-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



Se añadió éster metílico del ácido 2-[3-piridin-2-iletinil-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (253 mg, 0,517 mmol) a una solución de NaOH (62 mg, 1,55 mmol); se disolvió en THF (1,0 ml), MeOH (2,25 ml), y agua (0,5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante

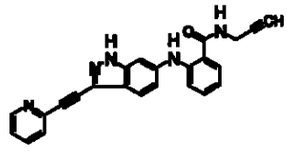
1 hora, al tiempo que la HPLC indica que todo el material de partida se ha consumido. La reacción se neutralizó con HCl 1N, extraído con acetato de etilo, el cual se lavó entonces con salmuera y se secó con $MgSO_4$. Después de concentrar a vacío, se obtuvieron 249 mg de sólido amarillo (99% de masa recobrada). Este material se usó sin purificación adicional. ESIMS ($M-H^-$): 483,0.

Ejemplo 3(p) Ácido 2-[3-piridin-2-iletinil-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



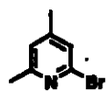
Una disolución de ácido 2-[3-piridin-2-iletinil-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (231 mg, 0,477), fluoruro de tetrabutilamonio 1M en THF (3,8 ml, 3,816 mmol), y etilendiamina (127 µl, 1,908 mmol), se agitaron en un baño de aceite a 80 grados durante 6 horas. La reacción se desactivó con ácido acético (218 µl, 3,816 mmol), diluido con agua, y extraído con acetato de etilo (10 x 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre $MgSO_4$. Después de concentrarse se formó un sólido que se trituró con CH_2Cl_2, dando el producto en forma de polvo amarillo (124 mg, 73%). ESIMS ($M-H^-$): 353,0.

Ejemplo 3(q) N-prop-2-inil-2-[3-((E)-2-piridin-2-il-vinil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Una disolución de ácido 2-(3-piridin-2-iletinil-1H-indazol-6-ilamino)-benzoico (41 mg, 0,117 mmol), propargilamina (24 µl, 0,35 mmol), trietilamina (81 µl, 0,58 mmol), disuelta en DMF (0,5 ml), se trató con HATU (89 mg, 0,233 mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche, después se purificó mediante HPLC de fase inversa que produce 27 mg (59%) del compuesto título como un sólido amarillo. ^{1}H NMR (DMSO- d_6): δ 9,78 (1H, s), 8,99 (1H, m), 8,61 (1H, d, J = 2,1), 7,88 (1H, s), 7,72 (3H, m), 7,43 (4H, m), 7,29 (1H, s), 7,04 (1H, d, J = 7,3), 6,91 (1H, t, J = 5,2), 4,04 (2H, s), 3,04 (1H, s). ESIMS ($M+H^+$): 392,1.

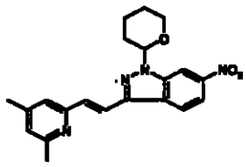
Ejemplo 4(a): 2-bromo-4,6-dimetil-piridina



Una disolución de HBr al 48% (acuosa) (Aldrich, 65 ml, 1,2 mol, 10 eq) se enfrió a –5ºC y se trató con 4,6-dimetil-piridin-2-ilamina (Aldrich, 15,0 g, 0,12 mol. 1,0 eq). La mezcla de sal gruesa blanca se agitó con un agitador mecánico mientras se añadía bromo gota a gota (Aldrich, 19,7 ml, 0,38 mol, 3,1 eq). La mezcla roja resultante se trató con una disolución acuosa (32 ml H_2O) de $NaNO_2$ (Aldrich, 22,1 g, 0,32 mol, 2,6 eq) durante una hora. La temperatura se mantuvo por debajo de 5ºC durante la adición de nitrito, y después se calentó gradualmente hasta 20ºC durante 2 horas. La mezcla de reacción se ajustó a pH 14 con NaOH (acuoso), y se extrajo con MTBE. Los extractos orgánicos se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y concentraron bajo presión reducida. El producto bruto (29 g de un aceite rojo)

se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (sílice, 350 g) y eluyó con acetato de etilo-ciclohexano al 2-7%, lo cual dio un aceite naranja (11,0 g, 48%). ^{1}H NMR (DMSO- d_6, 300 MHz) δ 7,30 (1H, s), 7,13 (1H,s), 2,39 (3H, s), 2,26 (3H, s). ^{13}C NMR (DMSO- d_6, 75 MHz) δ 159,4, 151,3, 140,9, 125,7, 124,0, 23,7, 20,3. ESI m/z 186/188 $(M + H)^+$.

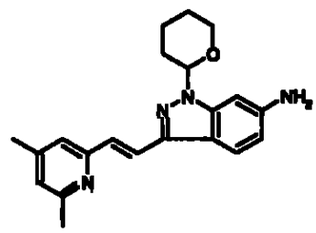
Ejemplo 4(b): 3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-6-nitro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol



Una suspensión de 2-bromo-4,6-dimetilpiridina (2,42 g, 13 mmol), 3-vinil-6-nitro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol (2,37 g, 8,67 mmol), acetato de paladio (0,145 g, 0,65 mmol), tri-orto-tolilfosfina (0,791 g, 2,6 mmol), y diisopropiletilamina (2,4 ml, 13,8 mmol) en DMF acuoso (85%, 34,5 ml) se desgasificó burbujeando con argón durante 5 minutos, seguido de sonicación durante 5 minutos antes de calentar en un horno de microondas (300 watios, 10% de potencia) a 110°C durante 40 minutos. Después de enfriar, la mezcla se añadió gota a gota en agua fría. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración. Los sólidos se disolvieron en acetato de etilo, se secaron (sulfato de sodio), y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó en gel de sílice utilizando un gradiente de 0 a 20% de acetato de etilo en una mezcla de cloroformo y hexanos (1:1) como eluyente. Los productos resultantes de la cromatografía se trituraron con MTBE/hexanos para obtener un producto limpio en forma de sólido amarillo. Las aguas madres se repurificaron de una forma similar en gel de sílice, seguido de la trituración para obtener más producto

limpio con un rendimiento del 68%. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8,54 (1H, s), 8,15 (1H, d, J = 9,4 Hz), 8,08 (1H, dd, J = 9,04, 1,9 Hz), 7,87 (1H, d, J = 16,6 Hz), 7,55 (1H, d, J = 16,6 Hz), 7,14 (1H, s), 6,90 (1H, s), 5,82 (1H, dd, J = 9,0, 3,0 Hz), 4,08-4,01 (1H, m), 3,84-3,76 (1H, m), 2,56 (3H, s), 2,62-2,54 (1H, m), 2,34 (3H, s), 2,24-2,10 (2H, m), 1,88-1,68 (3H, m).

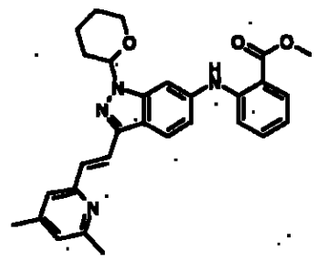
Ejemplo 5: 3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamina



Una suspensión de 3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-6-nitro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol (4,22 g, 11,16 mmol), hierro en polvo (2,71 g, 48,51 mmol) y NH_4Cl acuoso saturado (25 ml) en 25 ml de etanol se calentó a 45°C durante 18 horas. La reacción se enfrió y se filtró a través de papel de filtro lavando con metanol. Los disolventes se eliminaron bajo presión reducida y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2x). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron bajo presión reducida para dar 4,02 g (cuantitativos) de un sólido de color herrumbre y se usaron sin purificación adicional. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 7,79 (1H, s), 7,74 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,35 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,29 (1H, s), 6,96 (1H, s), 6,63 (2H, m), 5,57 (1H, dd, J = 2,4, 9,5 Hz), 5,44 (2H, s ancho), 3,88 (1H, m), 3,67 (1H, m), 2,45 (3H, s), 2,37 (1H, m), 2,29 (3H, s), 1,99 (2H, m),

1,73 (1H, m), 1,57 (2H, m).

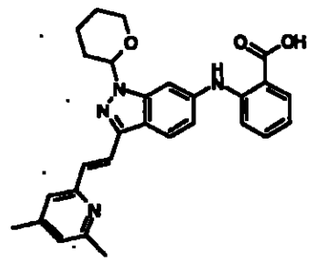
Ejemplo 6: Éster metílico del ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



Una suspensión agitada de 3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamina (870 mg, 2,5 mmol), éster metílico del ácido 2-bromo-benzoico (0,44 ml, 3,12 mmol), R-BINAP (78 mg, 0,125 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (29 mg, 0,03 mmol) y carbonato de cesio (1,22 g, 3,75 mmol) en tolueno (6 ml) se desgasificó y se calentó a 100ºC durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió, vertiéndose en $NaHCO_3$ saturado y extrayéndose con acetato de etilo (2x). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de 5-10% de acetato de etilo en CH_2Cl_2 para dar 964 mg (80%) de una espuma amarilla. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9,49 (1H, s), 8,13 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,94 (1H, dd, J = 1,5, 8,0 Hz), 7,85 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,58 (1H, d, J = 1,5, Hz), 7,48 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,47 (1H, m), 7,37 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,34 (1H, s), 7,19 (1H, dd, J = 1,7, 8,7 Hz), 6,99 (1H, s), 6,89 (1H, t, J = 8,1 Hz), 5,83 (1H, d, J = 7,2 Hz), 3,88 (3H, s), 3,75 (1H, m), 2,48 (3H, s), 2,41 (2H, m), 2,31 (3H, s), 2,02 (2H, m), 1,75 (1H, m), 1,59 (2H, m). *Anal.* Calcd. para

$C_{29}H_{30}N_4O_3 \cdot 0,15$ acetato de etilo: C, 71,71; H, 6,34; N, 11,30. Se encontró: C, 71,60; H, 6,14; N, 11,37.

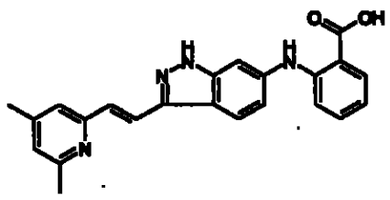
Ejemplo 7: Ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



A una disolución agitada de éster metílico del ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (1,98 g, 4,11 mmol) en THF:MeOH (12 ml, 3:1) se añadió hidróxido de potasio (1,15 g, 20,5 mmol) disuelto en agua (3 ml). La reacción se calentó a 70ºC durantre 2 horas, se enfrió, se concentró bajo presión reducida a aproximadamente 5 ml y se diluyó con más agua. La disolución se neutralizó con HCl 2N y el precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua para dar 2,00 g (cuantitativos) de un sólido amarillo brillante. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,12 (1H, s ancho), 9,82 (1H, s), 8,13 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,95 (1H, dd, J = 1,5, 8,0 Hz), 7,89 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,60 (1H, s), 7,50 (1H, d, J = 16,4), 7,46 (1H, d, J = 6,9), 7,37 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,20 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,06 (1H, s), 6,86 (1H, t, J = 6,9 Hz), 5,85 (1H, d, J = 7,3 Hz), 3,82 (2H, m), 2,50 (3H, s, oscurecido por la señal del dmso), 2,48 (2H, m), 2,34 (3H, s), 2,03 (2H, m), 1,76 (1H, m), 1,59 (2H, m). *Anal.* Calcd. para $C_{28}H_{28}N_4O_3 \cdot 0,5$ KOH: C, 67,72; H, 5,79; N, 11,28. Se encontró: C,

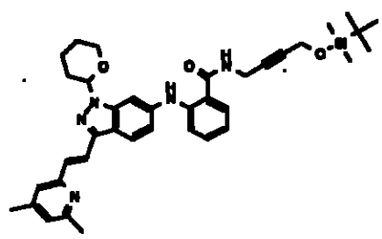
67,65; H, 5,88; N, 11,07.

Ejemplo 8:p-Toluenosulfonato del ácido 2-{3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzoico



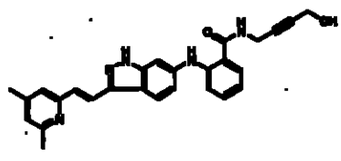
Una mezcla de ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzoico (2 mmol) y ácido p-tolueno sulfónico (10 mmol) en metanol acuoso (90%, 20 ml) se agitó a 70°C durante 18 horas. Después de enfriar, la suspensión amarilla espesa resultante se filtró, y los sólidos se lavaron con metanol para dar ácido 2-{3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzoico como la sal tosilato a un rendimiento del 85% como un sólido amarillo pálido. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,43 (1H, s), 9,78 (1H, s), 8,24-8,19 (2H, m), 8,09 (1H, d, J = 9,04 Hz), 7,95 (1H, dd, J = 7,9, 1,1 Hz), 7,62-7,55 (2H, m), 7,49-7,38 (5H, m), 7,20 (1H, dd, J = 9,0, 1,9 Hz), 7,09 (2H, d, J = 8,3 Hz), 6,86 (1H, dt, J = 7,9, 1,1 Hz), 2,67 (3H, s), 2,54 (3H, s), 2,27 (3H, s).

Ejemplo 9: N-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparada de forma similar a la que se describe para el Ejemplo 33(a) etapa (v), en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 09/609.335, presentada el 30 de junio de 2.000, incorporada en este documento mediante referencia en su totalidad para todos los propósitos, excepto por el uso de 4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inilamina y ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,56 (1H, s), 9,01 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,06 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,81 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,66 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,41 (4H, m), 7,32 (1H, s), 7,09 (1H, dd, J = 1,8, 8,7 Hz), 6,98 (1H, s), 6,89 (1H, t, J = 8,0 Hz), 5,79 (1H, dd, J = 2,4, 9,2 Hz), 4,28 (2H, s), 4,09 (2H, m), 3,86 (1H, m), 3,72 (1H, m), 2,46 (3H, s), 2,42 (1H, m), 2,30 (3H, s), 2,08 (2H, m), 1,74 (1H, m), 1,57 (2H, m), 0,80 (9H, s), 0,03 (6H, s). *Anal.* Calcd. para $C_{36}H_{47}N_5O_3Si \cdot 0,7\ H_2O$: C, 68,89; H, 7,36; N, 10,57. Se encontró: C, 68,99; H, 7,36; N, 10,21.

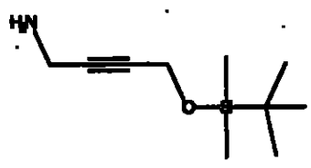
Ejemplo 10: 2-{3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ylamino}-N-(4-hidroxi-but-2-inil)-benzamida



Una disolución agitada de N-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida (737 mg, 1,13 mmol) y ácido p-tolueno-sulfónico (8,2 ml, 12% en ácido acético) se calentó a 70°C durante 2 horas. La reacción se enfrió, y se vertió cuidadosamente en solución saturada de $NaHCO_3$ y se extrajo con acetato de etilo (2x). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice fluyendo con CH_2Cl_2: acetato de etilo:MeOH (1:1:0,1) para dar 225 mg (44%) de un sólido blanco. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 12,91 (1H, s), 9,84 (s,1H), 9,01 (1H, t, J = 5,3 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,84 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,70 (1H, d, J = 7,2 Hz), 7,43 (3H, m), 7,31 (1H, s), 7,26 (1H, s), 7,02 (1H, dd, J = 1,6, 8,7 Hz), 6,97 (1H, s), 6,89 (1H, t, J = 6,7 Hz), 5,12 (1H, t, J = 5,8 Hz), 4,10 (2H, d, J = 5,3 Hz), 4,07 (2H, d, J = 5,8 Hz), 2,47 (3H, s), 2,31 (3H, s).

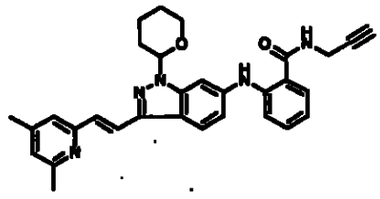
Anal. Calcd. para $C_{27}H_{25}N_5O_2 \cdot 1{,}1\ H_2O$: C, 68,80; H, 5,82; N, 14,86. Se encontró: C, 68,72; H, 5,81; N, 14,65.

Ejemplo 11: 4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inilamina



A una disolución enfriada con hielo y agitada del conocido 4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-in-1-ol (3,14 g, 15,7 mmol) en THF (50 ml) se añadió DBU (2,6 ml, 17,4 mmol) y DPPA (3,8 ml, 17,6 mmol). La disolución se calentó a temperatura ambiente y se agitó bajo una atmósfera inerte durante toda una noche. La reacción se vertió sobre $NaHCO_3$ saturado y las fases se separaron. La fase acuosa se reextrajo con acetato de etilo (2x) y las fases orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO4), y se concentraron a vacío. La trifenilfosfina (4,61 g, 17,6 mmol) se añadió a esta azida bruta disuelta en THF (50 ml), seguida por la adición de H_2O (0,44 ml). La disolución resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente, se concentró bajo presión reducida, y el residuo fue puesto en suspensión en una mezcla 1:1 de Et_2O/éter de petróleo. Los sólidos se eliminaron y el filtrado se concentró y purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con CH_2Cl_2/MeOH (19:1) para dar un aceite ambarino. ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 4,19 (2H, t, J = 1,9 Hz), 3,33 (2H, t, J = 1,9 Hz), 0,79 (9H, s), 0,00 (6H, s).

Ejemplo 12: 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-N-prop-2-inil-benzamida

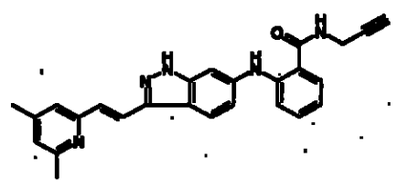


Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-(4,6-

dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y propargilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,87 (1H, s), 9,04 (1H, t, J = 5,8 Hz), 8,08 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,83 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,69 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,44 (4H, m), 7,34 (1H, s), 7,12 (1H, dd, J = 1,7, 8,7 Hz), 6,99 (1H, s), 6,91 (1H, t, J = 5,8 Hz), 5,81 (1H, dd, J = 2,4, 9,2 Hz), 4,07 (2H, dd, J = 2,5, 5,7 Hz), 3,88 (1H, m), 3,74 (1H, m), 3,12 (1H, t, J = 2,5 Hz), 2,48 (3H, s), 2,43 (1H, s), 2,31 (3H, m), 2,01 (2H, m), 1,74 (1H, m), 1,58 (2H, m).

Anal. Calcd. para $C_{31}H_{31}N_5O_2 \cdot 1{,}1\ H_2O \cdot 0{,}3$ TBME: C, 70,73; H, 6,72; N, 12,69. Se encontró: C, 70,56; H, 6,45; N, 12,49.

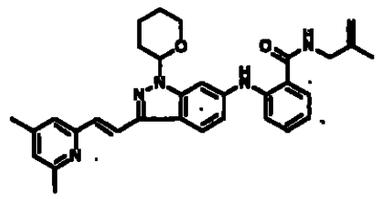
Ejemplo 13: N-(prop-2-inil)-2-{3-[(E)-2-(2,4-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7 anteriormente en este documento, excepto en el uso de *N*-(3-ciclopropil-prop-2-inil)-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida en lugar de N-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,90 (1H, s), 9,78 (1H, s), 9,01 (1H, t, J = 5,3 Hz), 8,06 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,84 (1H, d, J = 16,2 Hz), 7,68 (1H, dd, J = 7,9, 1,1 Hz), 7,45-7,36 (3H, m), 7,30 (1H, s), 7,25 (1H, d, J = 1,5 Hz), 7,01 (1H, dd, J = 8,7, 1,9 Hz), 6,96 (1H, s), 6,88 (1H, dt, J = 6,8, 1,9 Hz), 4,04 (2H, dd, J =

5,6, 2,6 Hz), 3,11 (1H, t, J = 2,6 Hz), 2,46 (3H, s), 2,29 (3H, s).

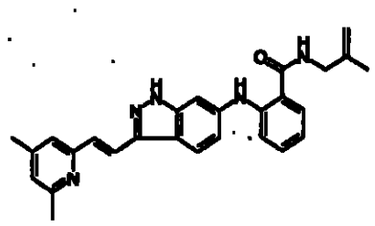
Ejemplo 14: 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-N-(2-metil-alil)-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y 2-metilalilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,87 (1H, s), 8,82 (1H, t, J = 5,8 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,82 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,74 (1H, d, J = 7,3 Hz), 7,43 (4H, m), 7,33 (1H, s), 7,10 (1H, d, J = 8,7 Hz), 6,99 (1H, s), 6,92 (1H, t, J = 7,8 Hz), 5,80 (1H, dd, J = 2,2, 9,2 Hz), 4,83 (2H, d, J = 11,8 Hz), 3,83 (4H, m), 2,47 (3H, s), 2,44 (1H, m), 2,31 (3H, s), 2,00 (2H, m), 1,75 (1H, m), 1,73 (3H, s), 1,58 (2H, m).

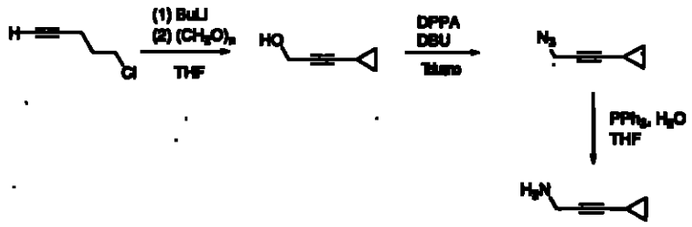
Anal. Calcd. para $C_{32}H_{35}N_5O_2 \cdot 1{,}09\ H_2O$: C, 71,00; H, 6,92; N, 12,94. Se encontró: C, 71,40; H, 6,89; N, 12,54.

Ejemplo 15: 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino]-N-(2-metil-alil)-benzamida

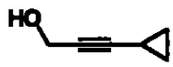


Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7 anteriormente en este documento, excepto en el uso de *N*-(2-metil-alil)-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida en lugar de N-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,89 (1H, s), 9,75 (1H, s), 8,79 (1H, t, J = 5,6 Hz), 8,05 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,85 (1H, d, J = 16,2 Hz), 7,74 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,45-7,33 (4H, m), 7,23 (1H, d, J = 1,5 Hz), 7,00-6,97 (2H, m), 6,90 (1H, dt, J = 7,9, 1,1 Hz), 4,81 (2H, d, J = 11,3 Hz), 3,81 (2H, d, J = 5,6 Hz), 2,47 (3H, s), 2,30 (3H, s), 1,71 (3H, s).

Esquema de Síntesis Alternativo



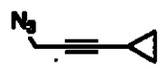
Ejemplo 16(a): Ciclopropil-prop-2-in-1-ol



A un matraz de fondo redondo que contiene 70 ml de THF anhidro

enfriado en un baño de hielo a –10°C se añadió 65,6 ml de una disolución BuLi 1,6M en hexanos (105 mmol). Se introdujo 5-cloro-pent-1-ino (5,13 g, 50 mmol) lentamente mientras se mantiene la temperatura a desde –10 hasta 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 2 horas bajo argón. Se añadió paraformaldehído (3 g, 100 mmol) en forma sólida. La mezcla se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante toda una noche bajo argón. Al día siguiente, se añadió agua y se añadieron aproximadamente 50 ml de HCl acuoso 1N. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante una columna eluyendo con Et_2O al 20% en hexanos para dar 3 g de 3-ciclopropil-prop-2-in-1-ol como un aceite (62% de rendimiento). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 4,22 (dd, 2H, J = 6,04, 2,01 Hz), 1,46 (t, 1H, J = 6,04 Hz), 1,26 (m, 1H), 0,77 (m, 2H), 0,70 (m, 2H).

Ejemplo 16(b): 3-ciclopropil-prop-2-inilazida



Se disolvió 3-ciclopropil-prop-2-in-1-ol (3,28 g, 34,1 mmol) en 40 ml de tolueno, se añadió DPPA (11, 26 g, 40,9 mmol), seguido de DBU (6,24 g, 40,9 mmol) mientras se mantiene la temperatura con un baño de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora y se diluyó con 100 ml de hexano y 15 ml de CH_2Cl_2. La mezcla se lavó con agua cuatro veces y una vez con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró con rotavapor con baño de agua fría para eliminar la mayoría del disolvente orgánico dejando algo

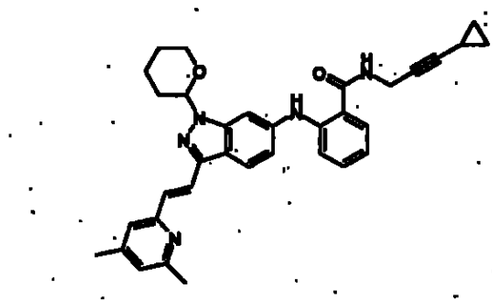
de tolueno (producto volátil). El aceite residual se usó para el paso siguiente. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 3,85 (s, 2H), 1,26 (m, 1H), 0,80 (m, 2H), 0,72 (m, 2H).

Ejemplo 16(c): 3-ciclopropil-prop-2-inilamina



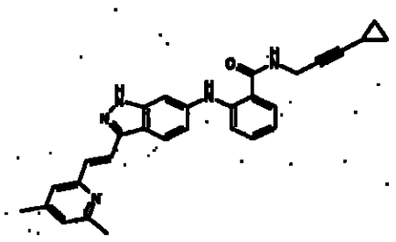
Se disolvió 3-ciclopropil-prop-2-inilazida (aproximadamente 34 mmol) en 100 ml de THF, se añadió 1 ml de agua, seguido por la adición de PPh_3 (13,37 g, 51 mmol) en forma de un sólido blanco mientras la temperatura se mantiene con un baño de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió 150 ml de una solución acuosa 1N de HCl a la mezcla. La mezcla se lavó con cloruro de metileno tres veces. La fase acuosa se basificó con NaOH 5 N a pH 10-12. La mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se examinó con TLC tiñendo para seguir el progreso de la extracción de amina a la fase orgánica. La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró para dar 1,62 g del producto deseado (producto volátil, contiene acetato de etilo disolvente residual) (50% de rendimiento para los dos pasos). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 3,37 (d, 2H, J = 2 Hz), 1,22 (m, 1H), 0,74 (m, 2H), 0,65 (m, 2H).

Ejemplo 17: *N*-(3-ciclopropil-prop-2-inil)-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida



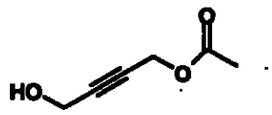
Se preparó de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico E y 3-ciclopropil-prop-2-inilamina. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 9,51 (1H, s), 7,97 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,81 (1H, d, J = 16,6 Hz), 7,51-7,42 (3H, m), 7,34-7,29 (2H, m), 7,16 (1H, s), 7,11 (1H, dd, J = 9,0, 1,9 Hz), 6,85 (1H, s), 6,81 (1H, dt, J = 7,2, 1,1 Hz), 6,23 (1H, t, J = 7,2 Hz), 5,61 (1H, dd, J = 9,0, 2,6 Hz), 4,17 (2H, dd, J = 5,3, 2,3 Hz), 4,07-4,00 (1H, m), 3,75-3,66 (1H, m), 2,63-2,50 (1H, m), 2,54 (3H, s), 2,32 (3H, s), 2,20-2,02 (2H, m), 1,79-1,62 (3H, m), 1,29-1,19 (1H, m), 0,77-0,67 (4H, m).

Ejemplo 18: *N*-(3-cicloprop-2-inil)-2-[3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7 anteriormente en este documento, excepto en el uso de 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-N-prop-2-inil-benzamida en lugar de N-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,90 (1H, s), 9,79 (1H, s), 8,91 (1H, t, J = 5,6 Hz), 8,06 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,83 (1H, d, J = 16,2 Hz), 7,68 (1H, dd, J = 7,9, 1,1 Hz), 7,49-7,38 (3H, m), 7,29 (1H, s), 7,25 (1H, d, J = 1,9 Hz), 6,99 (1H, dd, J = 9,0, 2,3 Hz), 6,96 (1H, s), 6,88 (1H, dt, J = 7,9, 1,5 Hz), 4,00 (2H, dd, J = 5,6, 1,9 Hz), 2,46 (3H, s), 2,29 (3H, s), 1,31-1,23 (1H, m), 0,75-0,70 (2H, m), 0,57-0,52 (2H, m).

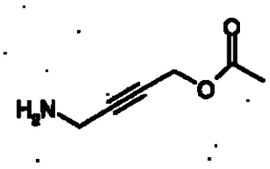
Ejemplo 19(a): Monoacetato de 2-butino-1,4-diol



A una disolución de butino-1,4-diol (5 g, 58 mmol) en THF seco a ta se le añadió en porciones hidruro de sodio (dispersión en aceite al 60%, 2,32 g, 58 mmol). Después de 4,3 horas, se añadió cloruro de acetilo (4,12 ml, 58 mmol). Después de agitar a ta durante 22 horas, la mezcla se concentró bajo presión

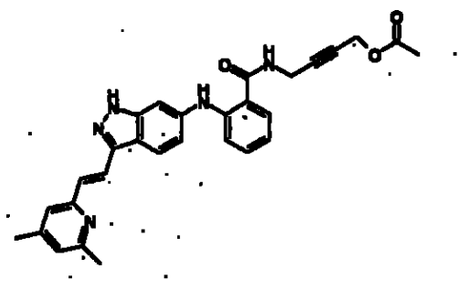
reducida. El residuo se concentró dos veces a partir de tolueno antes de la purificación sobre gel de sílice usando acetato de etilo/diclorometano (1:3) como eluyente para dar monoacetato de 2-butino-1,4-diol en forma de aceite con un rendimiento del 49%. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 5,23 (1H, sa), 4,70 (2H, t, J = 1,8 Hz), 4,09 (2H, s), 2,03 (3H, s).

Ejemplo 19(b): Éster 4-amino-but-2-inílico del ácido acético



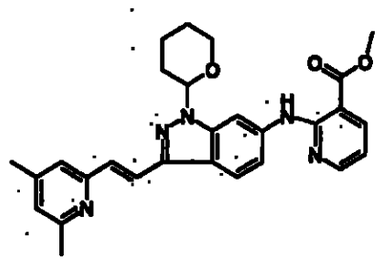
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 8 excepto en que se usó monoacetato de 2-butino-1,4-diol en lugar de 4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-in-1-ol. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 4,77 (2H, s), 4,20 (2H, s), 2,04 (3H, s).

Ejemplo 20: Éster 4-(2-{3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1*H*-indazol-6-ilamino}-benzoilamino)-but-2-inílico del ácido acético



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de p-toluensulfonato del ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzoico y éster 4-amino-but-2-inílico del ácido acético. ^{1}H NMR (CD_3CN): δ 11,00 (1H, sa), 9,59 (1H, s), 7,99 (1H, d, J = 8,6 Hz), 7,86 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,58 (1H, d, J = 7,8 Hz), 7,49-7,37 (4H, m), 7,32 (1H, s), 7,21 (1H, s), 7,06 (1H, dd, J = 8,8, 1,8 Hz), 6,96 (1H, s), 6,90 (1H, t, J = 7,8 Hz), 4,63 (2H, s), 4,16 (2H, d, J = 5,6 Hz), 2,49 (3H, s), 2,32 (3H, s), 2,01 (3H, s).

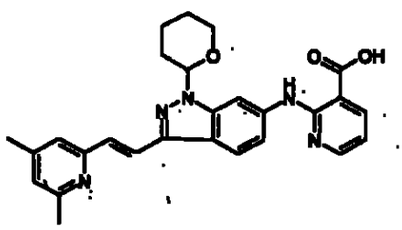
Ejemplo 21: Éster metílico del ácido 2-[3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]- nicotínico



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 3 anteriormente en este documento, excepto en el uso de éster metílico del ácido 2-bromo-nicotínico en lugar del éster metílico del ácido 2-bromo-benzoico. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 10,36 (1H, s), 8,50 (1H, dd, J = 4,7, 1,9 Hz), 8,36 (1H, d, J = 1,4 Hz), 8,30 (1H, dd, J = 7,8, 2,0 Hz), 8,08 (1H, d, J = 8,8 Hz), 7,83 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,48 (1H, d, J = 7,5), 7,44 (1H, s), 7,33 (1H, s), 6,98-6,93 (2H, m), 5,80 (1H, d, J = 7,0 Hz), 2,93 (3H, s), 3,93-3,90 (1H, m), 3,80-3,75 (1H, m), 2,46 (3H, s), 2,30 (3H, s), 2,10-1,97 (2H, m), 1,89-1,60 (3H, m).

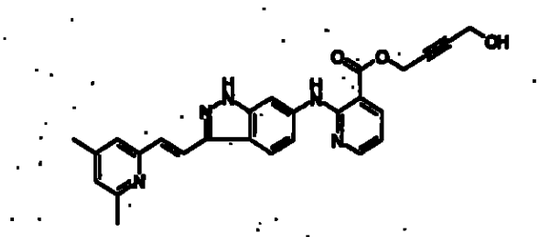
Ejemplo 22: Ácido 2-[3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-

piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotínico



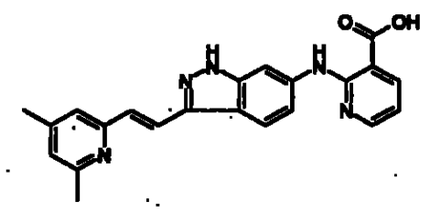
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 4 anteriormente en este documento, excepto en el uso de éster metílico del ácido 2-[3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotínico en lugar de éster metílico del ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 10,73 (1H, s), 8,49 (1H, d, J = 1,9 Hz), 8,45 (1H, s), 8,31 (1H, dd, J = 7,7, 1,8 Hz), 8,16-7,97 (3H, m), 7,70 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,50 (1H, d, J = 8,6Hz), 7,37 (1H, s), 6,96 (1H, dd, J = 7,7, 4,8 Hz), 5,87 (1H, d, J = 8,4 Hz), 3,95-3,90 (1H, m), 3,79-3,70 (1H, m), 2,63 (3H, s), 2,47 (3H, s), 2,07-1,99 (2H, m), 1,81-1,62 (3H, m).

Ejemplo 23: 2-{3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-N-(4-hidroxi-but-2-inil)-nicotinamida



Una mezcla bruta de N-(4-hidroxi-but-2-inil)-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotinamida y *N*-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotinamida se preparó a partir de ácido 2-[3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotínico y 4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inilamina de un modo similar al que se describe para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, y subsiguientemente se convierte en 2-[3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-N-(4-hidroxi-but-2-inil)-nicotinamida de un modo similar al que se describe para el ejemplo 7 excepto en el uso de una mezcla de N-(4-hidroxi-but-2-inil)-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotinamida y *N*-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotinamida en lugar de *N*-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,99 (1H, s), 11,21 (1H, s), 9,26 (1H, t, J = 5,3 Hz), 8,50 (1H, d, J = 1,9 Hz), 8,41 (1H, dd, J = 4,9, 1,9 Hz), 8,16 (1H, dd, J = 8,3, 1,9 Hz), 8,04 (1H, d, J = 9,0 Hz), 7,85 (1H, d, J = 16,6 Hz), 7,42 (1H, d, J = 16,6 Hz), 7,31 (1H, s), 7,06 (1H, dd, J = 8,7, 1,5 Hz), 6,96 (1H, s), 6,93 (1H, dd, J = 7,5, 4,9 Hz), 5,14 (1H, t, J = 5,6 Hz), 4,16 (2H, d, J = 5,6 Hz), 4,08 (2H, d, J = 7,2 Hz), 2,46 (3H, s), 2,30 (3H, s).

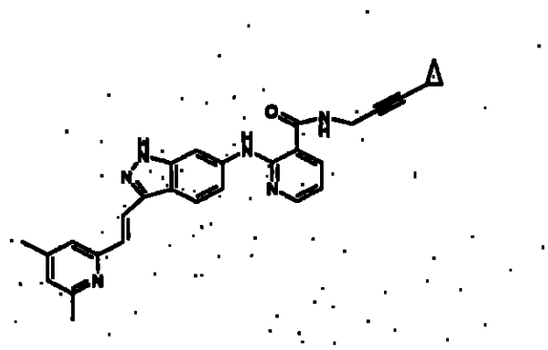
Ejemplo 24: p-toluenosulfonato del ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotínico



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 5 excepto en el uso de ácido 2-[3-[(E)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotínico en lugar de ácido 2-[3-[2-(4,6- dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzoico.

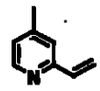
^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,49 (1H, s), 10,80 (1H, s), 8,63 (1H, d, J = 1,5 Hz), 8,49 (1H, dd, J = 4,8, 1,9 Hz), 8,31 (1H, dd, J = 7,7, 1,9 Hz), 8,24-8,19 (2H, m), 8,06 (1H, d, J = 8,8 Hz), 7,60-7,55 (2H, m), 7,46 (2H, d, J = 8,1 Hz), 7,22 (1H, dd, J = 8,8, 1,7 Hz), 7,09 (2H, d, J = 7,9 Hz), 6,95 (1H, dd, J = 7,7, 4,7 Hz), 2,66 (3H, s), 2,54 (3H, s), 2,27 (3H, s).

Ejemplo 25: *N*-(3-ciclopropil-prop-2-inil)-2-[3-[(e)-2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1*H*-indazol-6-ilamino]-nicotinamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de p-toluenosulfonato del ácido 2-{3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1*H*-indazol-6-ilamino}-nicotínico y 3-ciclopropil-prop-2-inilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,01 (1H, s), 11,20 (1H, s), 9,19 (1H, ta), 8,51 (1H,s), 8,40 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,15 (1H, d, J = 7,5 Hz), 8,05 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,83 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,42 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,31 (1H, s), 7,05 (1H, d, J = 8,3 Hz), 6,96 (1H, s), 6,92 (1H, dd, J = 7,5, 4,9 Hz), 4,06 (2H, d, J = 4,14 Hz), 2,46 (3H, s), 2,29 (3H, s), 1,33-1,28 (1H, m), 0,77-0,72 (2H, m), 0,60-0,55 (2H, m).

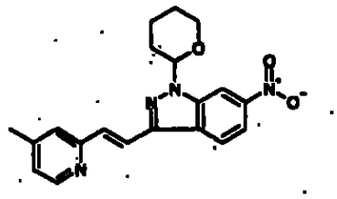
Ejemplo 26: 4-metil-2-vinil-piridina



Una mezcla amarilla de 2-bromo-4-metil-piridina (Aldrich, 5,2 g, 30,5 mmol. 1,0 eq), 2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol (Aldrich, 67 mg, 0,3 mmol., 1% mol), tributil-vinil-stannano (Aldrich, 26,8 ml, 91,5 mmol., 3,0 eq) y tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0) (Strem, 1,8 g, 1,5 mmol, 5% mol) en tolueno (100 ml) se desgasificó y se purgó con argón. Se obtuvo una disolución ambarina después de que la mezcla se calentara a 100ºC. La mezcla de reacción se desactivó después de 18 horas por la adición de HCl 1,0 M. El extracto ácido se lavó con éter, se ajustó a pH 9 con bicarbonato sódico sólido, y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron

bajo presión reducida. El producto bruto (3,7 g de un aceite marrón) se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (sílice) y se eluyó con acetato de etilo-diclorometano 0,5%, el cual dio un aceite transparente (1,9 g, 53%). ^{1}H NMR (DMSO- d_6, 300 MHz) δ 8,39 (1H, d, J = 4,9 Hz), 7,33 (1H, s), 7,10 (1H, dd, J = 5,0, 0,8 Hz), 6,77 (1H, dd, J = 17,5, 10,8 Hz), 6,20 (1H, dd, J = 17,5, 1,7 Hz), 5,44 (1H, dd, J = 10,8, 1,8 Hz), 2,31 (3H, s). ESIMS m/z 120 $(M + H)^+$.

Ejemplo 27: 3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-6-nitro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol

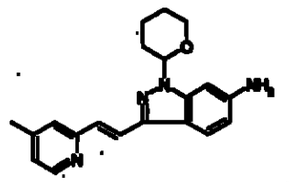


Una suspensión de 4-metil-2-vinil-piridina (ejemplo 23) (1,9 g, 15,97 mmol), 6-Nitro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-3-vinil-1H-indazol (4,96 g, 13,3 mmol), $Pd(OAc)_2$ (149 mg, 0,66 mmol), P(o-tolil)$_3$, y DIEA (3,5 ml, 19,96 mmol) en DMF desgasificado (50 ml) se calentó bajo argón a 100°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió y los sólidos se eliminaron por filtración lavando con acetato de etilo. El filtrado se diluyó con acetato de etilo y se lavó con salmuera (2x), se secó ($MgSO_4$) y se concentró bajo presión reducida. El residuo se cromatografió sobre gel de sílice fluyendo con hexanos: acetato de etilo (3:1) para dar 3,40 g (70%) de un sólido amarillo brillante.

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8,56 (1H, s), 8,50 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,11 (2H, m), 7,89 (1H, d, J = 16,3 Hz), 7,61 (1H, s), 7,03 (1H, d, J = 4,3 Hz), 5,83 (1H, dd, J = 2,6, 9,0 Hz), 4,06 (1H, m), 3,82 (1H, m), 2,58 (1H, m), 2,39 (3H, s), 2,18 (2H,

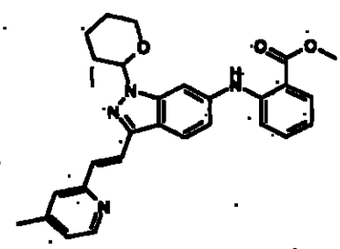
m), 1,78 (3H, m). *Anal.* Calcd. para $C_{20}H_{20}N_4O_3$: C, 65,92; H, 5,53; N, 15,38. Se encontró: C, 65,80; H, 5,52; N, 15,15.

Ejemplo 28: 3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamina



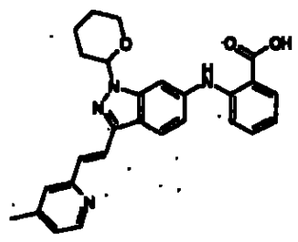
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 2 anteriormente en este documento, excepto en el uso de [2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-6-nitro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol (ejemplo 24) en lugar de 3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-6-nitro-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 8,43 (1H, d, J = 4,8 Hz), 7,79-7,73 (2H, m), 7,50 (1H, s), 7,39 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,09 (1H, d, J = 4,8 Hz), 6,64-6,62 (2H, m), 5,57 (1H, dd, J = 9,8, 2,5 Hz), 5,48 (2H, sa), 3,92-3,85 (1H, m), 3,72-3,64 (1H, m), 2,43-2,34 (1H, m), 2,33 (3H, s), 2,07-2,00 (1H, m), 1,96-1,90 (1H, m), 1,79-1,66 (1H, m), 1,60-1,53 (2H, m).

Ejemplo 29: Éster metílico del ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 3 excepto en el uso de 3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamina en lugar de 3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,48 (1H, s), 8,45 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,13 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,93 (1H, dd, J = 8,3, 1,9 Hz), 7,86 (1H, d, J = 16,2 Hz), 7,58 (1H, d, J = 1,9 Hz), 7,54-7,44 (3H, m), 7,36 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,18 (1H, dd, J = 8,7, 1,9 Hz), 7,11 (1H, d, J = 4,9 Hz), 6,87 (1H, t, J = 8,3 Hz), 5,83 (1H, dd, J = 9,4, 2,3 Hz), 3,87 (3H, 1H), 3,93-3,84 (1H, m), 3,77-3,69 (1H, m), 2,46-2,37 (1H, m), 2,34 (3H, s), 2,10-1,94 (2H, m), 1,81-1,53 (3H, m).

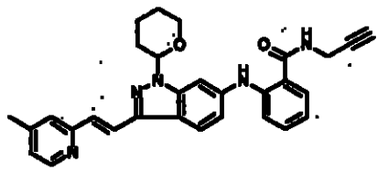
Ejemplo 30: Ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 4 anteriormente en este documento, excepto por el uso de éster metílico del ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico en lugar de éster metílico del ácido 2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico (ejemplo 3). ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,17 (1H, s ancho), 9,83 (1H, s), 8,51 (1H, d, J = 5,2 Hz),

8,14 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,95 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,94 (1H, dd, J = 1,5, 8,0 Hz), 7,73 (1H, s), 7,60 (1H, d, J = 1,5 Hz), 7,59 (1H, s), 7,54 (1H, s), 7,46 (1H, m), 7,37 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,23 (2H, m), 6,86 (1H, t, J = 6,9 Hz), 5,87 (1H, d, J = 7,6 Hz), 3,90 (1H, m), 3,76 (1H, m), 2,45 (1H, m), 2,41 (3H, s), 2,03 (2H, m), 1,77 (1H, m), 1,59 (2H, m).

Ejemplo 31: 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-N-prop-2-inil-benzamida

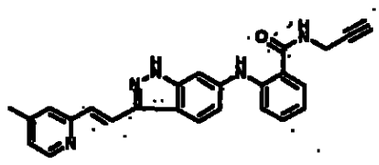


Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de propargilamina y ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,87 (1H, s), 9,03 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,08 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,86 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,69 (1H, d, J = 7,3 Hz), 7,53 (1H, s), 7,44 (4H, m), 7,13 (2H, m), 6,91 (1H, t, J = 7,9 Hz), 5,81 (1H, dd, J = 2,2, 9,6 Hz), 4,07 (2H, dd, J = 2,5, 5,5 Hz), 3,89 (1H, m), 3,75 (1H, m), 3,12 (1H, t, J = 2,5 Hz), 2,42 (1H, m), 2,36 (3H, s), 2,00 (2H, m), 1,75 (1H, m), 1,58 (2H, m).

Anal. Calcd. para $C_{30}H_{29}N_5O_2 \cdot 0,25$ TBME: C, 73,07; H, 6,28; N, 13,64. Se encontró: C, 72,95; H, 6,30; N, 13,64.

Ejemplo 32: 2-{3-[(E)-2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-N-

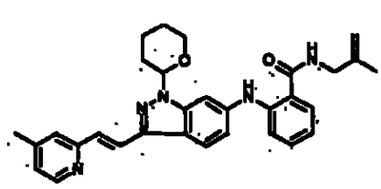
prop-2-inil-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7 anteriormente en este documento, excepto en el uso de 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-N-prop-2-inil-benzamida en lugar de N-[4-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,93 (1H, s), 9,79 (1H, s), 9,02 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,45 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,08 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,88 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,69 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,45 (4H, m), 7,27 (1H, s), 7,10 (1H, d, J = 4,9 Hz), 7,03 (1H, d, J = 8,8 Hz), 6,90 (1H, t, J = 7,9 Hz), 4,06 (2H, dd, J = 2,4, 5,4 Hz), 3,12 (1H, t, J = 2,4 Hz), 2,35 (3H, s).

Anal. Calcd. para $C_{25}H_{21}N_5O \cdot 0{,}35\ CH_2Cl_2$: C, 69,64; H, 5,00; N, 16,02. Se encontró: C, 69,65; H, 5,15; N, 15,80.

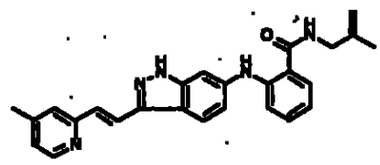
Ejemplo 33: N-(2-metil-alil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de 2-metil-alilamina y ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,86 (1H, s), 8,81 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,86 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,75 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,54 (1H, s), 7,50 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,43 (3H, m), 7,11 (2H, m), 6,92 (1H, t, J = 8,1 Hz), 5,81 (1H, dd, J = 2,5, 9,8 Hz), 4,83 (2H, d, J = 11,5 Hz), 3,81 (4H, m), 2,41 (1H, m), 2,35 (3H, s), 2,00 (2H, m), 1,76 (1H, m), 1,73 (3H, s), 1,58 (2H, m).

Anal. Calcd. para $C_{31}H_{33}N_5O_2 \cdot 0{,}80$ TBME: C, 72,71; H, 7,43; N, 12,11. Se encontró: C, 72,43; H, 7,57; N, 12,02.

Ejemplo 34: N-(2-metil-alil)-2-{[(E)-2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzamida

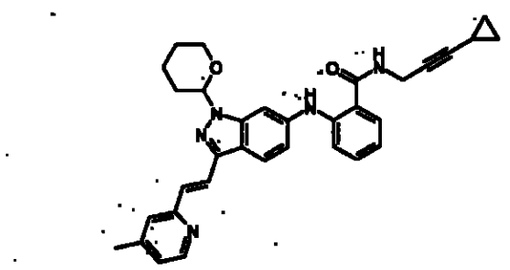


Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7, excepto en que se usó N-(2-metil-alil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida en lugar de N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,90 (1H, s), 9,76

(1H, s), 8,80 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,45 (1H, d, J = 5,1 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,88 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,75 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,51 (1H, s), 7,48 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,43 (2H, m), 7,24 (1H, s), 7,10 (1H, d, J = 4,9 Hz), 7,00 (1H, dd, J = 1,9, 8,9 Hz), 6,91 (1H, t, J = 8,1 Hz), 4,82 (2H, d, J = 11,3 Hz), 3,83 (2H, d, J = 5,8 Hz), 2,35 (3H, s), 1,73 (3H, s).

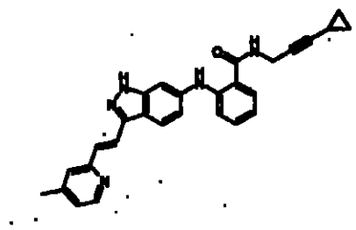
Anal. Calcd. para $C_{28}H_{25}N_5O \cdot 0{,}20\ H_2O$: C, 73,11; H, 5,99; N, 16,40. Se encontró: C, 73,13; H, 6,03; N, 16,13.

Ejemplo 35: *N*-(3-ciclopropil-prop-2-inil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida



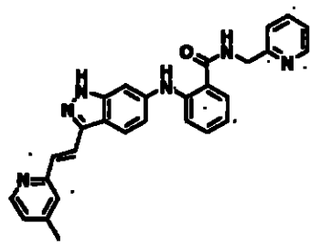
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y 3-ciclopropil-prop-2-inilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,88 (1H, sa), 8,93 (1H, ta), 8,46 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,08 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,85 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,69 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,54-7,40 (5H, m), 7,14-7,11 (2H, m), 6,90 (1H, t, J = 6,1 Hz), 5,81 (1H, d, J = 7,5, Hz), 4,02 (2H, d, J = 3,6 Hz), 3,95-3,85 (1H, m), 3,79-3,72 (1H, m), 2,49-2,35 (1H, m), 2,35 (3H, s), 2,15-2,01 (2H, m), 1,87-1,55 (3H, m), 1,30-1,25 (1H, m), 0,77-0,70 (2H, m), 0,59-0,54 (2H, m).

Ejemplo 36: N-(3-cicloprop-2-inil)-2-{3-[(E)-2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzamida



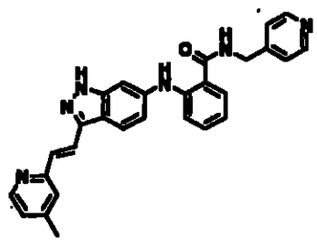
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7 anteriormente en este documento, excepto en el uso de N-(3-cicloprop-2-inil)-2-[3-[(E)-2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida en lugar de N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,91 (1H, s), 9,79 (1H, t), 8,91 (1H, d, J = 5,6 Hz), 8,44 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,06 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,87 (1H, d, J = 16,6 Hz), 7,67 (1H, dd, J = 7,9, 1,5 Hz), 7,50-7,35 (4H, m), 7,24 (1H, d, J = 1,9 Hz), 7,09 (1H, d, J = 4,9 Hz), 7,00 (1H, dd, J = 8,7, 1,5 Hz), 6,88 (1H, dt, J = 4,1, 1,5 Hz), 4,00 (2H, dd, J = 5,3, 1,9 Hz), 2,34 (3H, s), 1,31-1,23 (1H, m), 0,75-0,69 (2H, m), 0,56-0,52 (2H, m).

Ejemplo 37: 2-{3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-N-piridin-2-ilmetil-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 y el ejemplo 7 anteriormente en este documento excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzoico y C-piridin-2-il-metilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6, 300 MHz) δ 12,91 (1H, s), 9,77 (1H, s), 9,19 (1H, t, J = 5,8 Hz), 8,50 (1H, d, J = 4,1 Hz), 8,45 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,06 (1H, d, J = 8,8 Hz), 7,88 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,82-7,70 (2H, m), 7,51-7,25 (7H, m), 7,10 (1H, d, J = 4,6Hz), 6,98 (1H, dd, J = 8,8, 1,8 Hz), 6,96-6,91 (1H, m), 4,58 (2H, d, J = 5,9 Hz), 2,35 (3H, s). ESIMS m/z 461 $(M + H)^+$. *Anal.* Calcd. para $C_{28}H_{24}N_6O$ x 0,3 MTBE: C, 72,71; H, 5,77; N, 17,25. Se encontró: C, 72,38; H, 5,80; N, 16,88.

Ejemplo 38: 2-{3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-N-piridin-4-ilmetil-benzamida

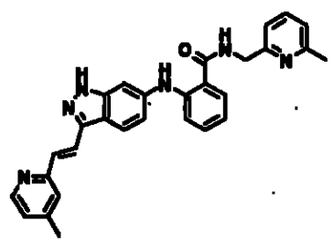


Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 y el ejemplo 7 anteriormente en este documento excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-

(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzoico y C-piridin-4-il-metilamina.

^{1}H NMR (DMSO- d_6, 300 MHz) δ 12,90 (1H, s), 9,73 (1H, s), 9,21 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,49-8,44 (3H, m), 8,06 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,88 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,81 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,51-7,40 (4H, m), 7,31 (2H, d, J = 5,9 Hz), 7,24 (1H, s), 7,11 (1H, d, J = 4,4 Hz), 7,00 (1H, dd, J = 8,7, 1,7 Hz), 6,97-6,92 (1H, m), 4,50 (2H, d, J = 5,9 Hz), 2,35 (3H, s). ESIMS m/z 461 $(M + H)^+$. *Anal.* Calcd. para $C_{28}H_{24}N_6O$ x 0,4 H_2O x 0,7 MTBE: C, 71,36; H, 6,45; N, 15,85. Se encontró: C, 71,27; H, 6,29; N, 15,53.

Ejemplo 39: N-(6-metil-piridin-2-ilmetil)-2-{3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzamida

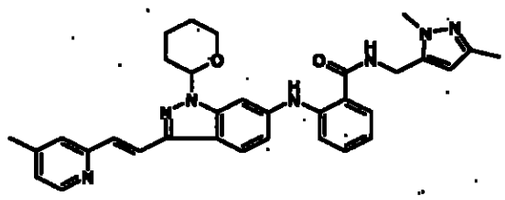


Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 y el ejemplo 7 anteriormente en este documento excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzoico y C-(6-metil-piridin-2-il)-metilamina.

^{1}H NMR (DMSO- d_6, 300 MHz) δ 12,92 (1H, s), 9,76 (1H, s), 9,20 (1H, t, J = 5,8 Hz), 8,44 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,05 (1H, d, J = 8,6 Hz), 7,86 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,81 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,59 (1H, t, J = 7,7 Hz), 7,49-7,37 (4H, m), 7,23

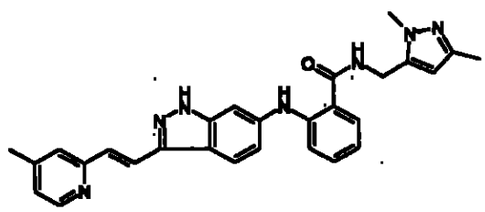
(1H, s), 7,11-7,08 (3H, m), 6,99 (1H, dd, J = 8,7, 1,6 Hz), 6,95-6,90 (1H, m), 4,51 (2H, d, J = 5,9 Hz), 2,42 (3H,s), 2,33 (3H, s). ESIMS m/z 475 $(M + H)^+$. *Anal.* Calcd. para $C_{29}H_{26}N_6O$ x 0,4 DCM: C, 68,98; H, 5,29; N, 16,39. Se encontró: C, 68,84; H, 5,42; N, 16,20.

Ejemplo 40: *N*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-ilmetil)-2-[(E)-3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida



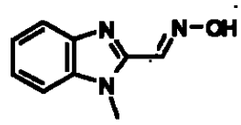
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y *C*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-il)-metilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,81 (1H, s), 9,05 (1H, ta), 8,46 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,85 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,71 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,54-7,40 (5H, m), 7,11-7,09 (2H, m), 6,91 (1H, t, J = 6,9 Hz), 5,94 (1H, s), 5,80 (1H, d, J = 7,3 Hz), 4,45 (2H, d, J = 5,5 Hz), 3,93-3,85 (1H, m), 3,78-3,69 (1H, m), 3,73 (3H, s), 2,45-2,35 (1H, m), 2,35 (3H, s), 2,07 (3H, s), 2,06-1,95 (2H, m), 1,85-1,53 (m, 3H).

Ejemplo 41: N-(2,5-dimetil-2H-pirazol-3-ilmetil)-2-{3-[(E)-2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7 anteriormente en este documento, excepto en el uso de *N*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-ilmetil)-2-{3-[(E)-2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino}-benzamida en lugar de N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,90 (1H, s), 9,70 (1H, s), 9,03 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,44 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,06 (1H, d, J = 9,0 Hz), 7,87 (1H, d, J = 16,2 Hz), 7,70 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,50-7,38 (4H, m), 7,22 (1H, s), 7,1 (1H, d, J = 5,6 Hz), 6,99 (1H, dd, J = 8,7, 1,5 Hz), 6,90 (1H, dt, J = 7,9, 1,9 Hz), 5,91 (1H, s), 4,43 (2H, d, J = 5,6 Hz), 3,72 (3H, s), 2,34 (3H, s), 2,05 (3H, s).

Ejemplo 42: 1-metil-1H-benzoimidazol-2-carbaldehído oxima

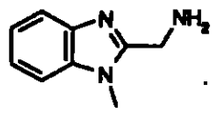


A una suspensión agitada de 1-metil-1H-benzoimidazol-2-carbaldehído (980 mg, 6,61 mmol) en H_2O (10 ml) se le añadió una solución de acetato de sodio (3,25 g, 39,68 mmol) y clorhidrato de hidroxilamina (1,38 g, 19,84 mmol) en 10 ml de H_2O. La reacción se agitó a ta durante 2 horas y el precipitado espeso se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó a vacío para dar 1,02 g (94%) de un sólido blanco. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,06 (1H, s), 8,28 (1H, s), 7,65 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,60 (1H, d, J = 6,8 Hz), 7,32 (1H, t, J = 7,2

Hz), 7,23 (1H, t, J = 6,8 Hz), 4,00 (3H, s).

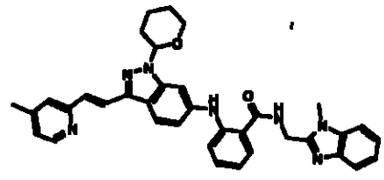
Anal. Calcd. para $C_9H_9N_3O$: C, 61,70; H, 5,18; N, 23,99. Se encontró: C, 61,80; H, 5,23; N, 23,98.

Ejemplo 43: Diclorhidrato de C-(1-metil-1H-benzoimidazol-2-il)-metilamina



Una botella de presión Parr se cargó con 1-metil-1H-benzoimidazol-2-carbaldehído oxima M (267 mg, 1,6 mmol), 10% paladio sobre carbono (75 mg) con ácido clorhídrico (2 gotas) y etanol (25 ml). La mezcla de reacción se sacudió bajo 45 PSI (310.275 kPa) de H_2 durante 2 horas antes de que el catalizador se eliminara por filtración. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo se trituró con Et_2O para dar 340 mg (90%) de un sólido blanco como la sal diclorhidrato y se usó sin purificación adicional. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8,87 (2H, s ancho), 7,72 (2H, m), 7,38 (2H, m), 4,50 (2H, s), 3,89 (3H, s).

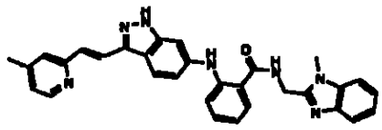
Ejemplo 44: N-(1-metil-1H-benzoimidazol-2-ilmetil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de clorhidrato de C-(1-metil-1H-benzoimidazol-2-il)-metilamina N y ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 9,82 (1H, s), 9,20 (1H, t, J = 5,3Hz), 8,46 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,85 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,74 (1H, d, J = 7,3 Hz), 7,58 (1H, d, J = 7,2 Hz), 7,50 (6H, m), 7,19 (4H, m), 6,92 (1H, t, J = 8,1 Hz), 5,78 (1H, dd, J = 2,5, 9,5 Hz), 4,79 (2H, d, J = 5,5 Hz), 3,89 (1H, m), 3,83 (3H, s), 3,71 (1H, m), 2,41 (1H, m), 2,35 (3H, s), 2,00 (2H, m), 1,74 (1H, m), 1,57 (2H, m).

Anal. Calcd. para $C_{38}H_{35}N_7O_2 \cdot 0{,}65$ hexanos: C, 73,31; H, 6,80; N, 15,00. Se encontró: C, 72,92; H, 6,90; N, 14,71.

Ejemplo 45: N-(1-metil-1H-benzoimidazol-2-ilmetil)-2-{3-[(E)2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-benzamida

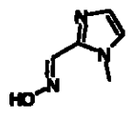


Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7 anteriormente en este documento, excepto en el uso de N-(1-metil-1H-benzoimidazol-2-ilmetil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida en lugar de N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,93 (1H, s), 9,73 (1H, s), 9,19 (1H, t, J = 5,3 Hz), 8,45 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,06 (1H, d, J = 8,5 Hz), 7,88 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,74 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,60-7,36 (6H, m), 7,29-7,14

(3H, m), 7,10 (1H, d, J = 4,7 Hz), 7,04 (1H, dd, J = 1,8, 8,9 Hz), 6,91 (1H, t, J = 7,3 Hz), 4,79 (2H, d, J = 5,3 Hz), 3,83 (3H, s), 2,35 (3H, s).

Anal. Calcd. para $C_{31}H_{27}N_7O \cdot 1{,}80\ H_2O\ 0{,}40\ CH_2Cl_2$: C, 65,02; H, 5,46; N, 16,91. Se encontró: C, 64,97; H, 5,82; N, 17,09.

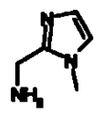
Ejemplo 46: 1-metil-1H-imidazol-2-carbaldehído oxima



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 39 excepto en que se usó 1-metil-1H-imidazol-2-carbaldehído en vez de 1-metil-1H-benzoimidazol-2-carbaldehído.

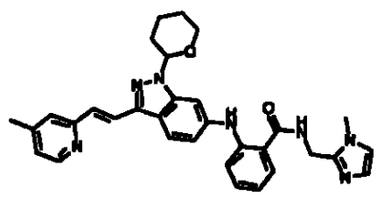
^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 11,50 (1H, s), 8,05 (1H, s), 7,28 (1H, s), 6,95 (1H, s), 3,80 (3H, s). *Anal.* Calcd. para $C_5H_7N_3O$: C, 47,99; H, 5,64; N, 33,58. Se encontró: C, 48,22; H, 5,58; N, 33,45.

Ejemplo 47: Diclorhidrato de C-(1-metil-1H-imidazol-2-il)-metilamina



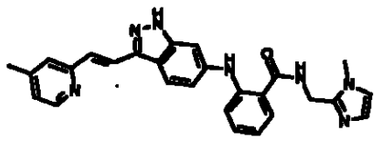
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 40 excepto en que se usó 1-metil-1H-imidazol-2-carbaldehído oxima en vez de 1-metil-1H-benzoimidazol-2-carbaldehído oxima. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 7,45 (1H, s), 7,29 (1H, s), 4,25 (2H, s), 3,79 (3H, s).

Ejemplo 48: N-(1-metil-1H-imidazol-2-ilmetil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de clorhidrato de C-(1-metil-1H-imidazol-2-il)-metilamina y ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,83 (1H, s), 9,03 (1H, t, J = 5,5), 8,45 (1H, d, J = 4,7 Hz), 8,09 (1H, d, J = 8,5 Hz), 7,85 (1H, d, J = 16,5 Hz), 8,67 (1H, d, J = 7,3 Hz), 7,53-7,39 (4H, m), 7,11 (3H, m), 6,90 (1H, d, J = 6,9 Hz), 6,86 (1H, s), 5,79 (1H, d, J = 8,9 Hz), 5,75 (1H, s), 4,54 (1H, d, J = 5,5 Hz), 3,85-3,70 (2H, m), 3,66 (3H, s), 2,35 (3H, s), 2,10 (2H, m), 1,70 (2H, m), 1,60 (3H, m). *Anal.* Calcd. para $C_{32}H_{33}N_7O_2 \cdot 0{,}8\ CH_2Cl_2$: C, 63,99; H, 5,672; N, 15,93. Se encontró: C, 63,95; H, 5,72; N, 16,01.

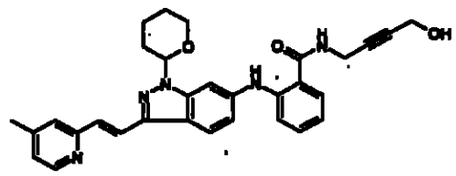
Ejemplo 49: N-(1-metil-1H-imidazol-2-ilmetil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]- 1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7 anteriormente en este documento, excepto en que N-(1-metil-1H-imidazol-2-ilmetil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-

ilamino]-benzamida se usó en lugar de N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,89 (1H, s), 9,72 (1H,s), 8,99 (1H,t,J=5,6 Hz),, 8,44 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,05 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,86 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,66 (1H, d, J = 6,7 Hz), 7,49-7,36 (4H, m), 7,24 (1H, m), 7,09 (2H, d, J = 8,1 Hz), 7,02 (1H, d, J = 8,8 Hz), 6,88 (1H, t, J = 6,9 Hz), 6,81 (1H, s), 4,52 (2H, d, J = 5,5 Hz), 3,29 (3H, s), 2,34 (3H, s). *Anal.* Calcd. para $C_{27}H_{25}N_7O \cdot 0{,}35\ CH_2Cl_2$: C, 66,59; H, 5,25; N, 19,88. Se encontró: C, 66,48; H, 5,65; N, 19,56.

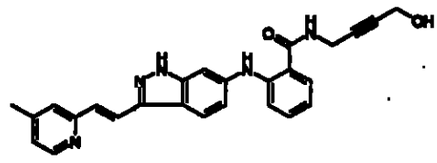
Ejemplo 50: *N*-(4-hidroxi-but-2-inil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6, excepto en el uso de ácido 2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y 4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inilamina. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 9,48 (H, s), 8,46 (1H, d, J = 5,3 Hz), 7,92 (1H, d, J = 9,0 Hz), 7,83 (1H, d, J = 16,2 Hz), 7,52 (1H, d, J = 16,6 Hz), 7,46-7,41 (2H, m), 7,34-7,31 (3H, m), 7,12 (1H, dd, J = 8,7, 1,9 Hz), 6,99 (1H, d, J = 4,9 Hz), 6,81 (1H, t, J = 6,8 Hz), 6,40 (1H, t, J = 4,9 Hz), 5,62 (1H, dd, J = 9,4, 3,0 Hz), 4,28-4,23

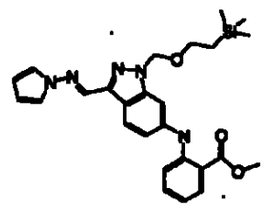
(4H, m), 4,08-4,01 (1H, m), 3,76-3,67 (1H, m), 2,63-2,49 (1H, m), 2,38 (3H, s), 2,22-2,06 (2H, m), 1,80-1,60 (3H, m).

Ejemplo 51: 2-{3-[(E)-2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1H-indazol-6-ilamino}-N-(4-hidroxi-but-2-inil)-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 7, excepto en el uso de una mezcla de *N*-(4-hidroxi-but-2-inil)-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida y N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4-metil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida en lugar de N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-[2-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-vinil]-1-(tetrahidro-piran-2-il)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,92 (1H, s), 9,83 (1H, s), 9,00 (1H, t, J = 5,3 Hz), 8,44 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,06 (1H, d, J = 9,0 Hz), 7,87 (1H, d, J = 16,6 Hz), 7,68 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,50-7,38 (4H, m), 7,26 (1H, s), 7,09 (1H, d, J = 5,3 Hz), 7,01 (1H, dd, J = 8,7, 1,5 Hz), 6,88 (1H, dt, J = 6,8, 1,5 Hz), 5,11 (1H, t, J = 3,0 Hz), 4,10-4,04 (4H, m), 2,34 (3H, s).

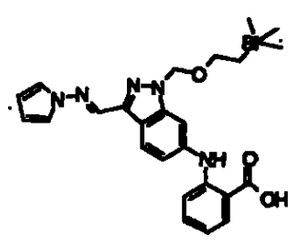
Ejemplo 52: Éster metílico del ácido 2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 2 y el ejemplo 3 anteriormente en este documento excepto en que se empieza con 6-nitro-3-estiril-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol en vez de 6-yodo-3-estiril-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol.

Este material se recogió como una mezcla bruta de producto y éster metílico de ácido 2-amino-benzoico en la etapa siguiente.

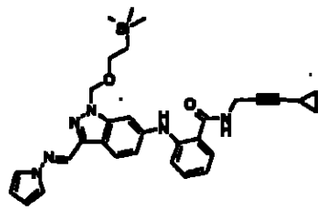
Ejemplo 53: Ácido 2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico



Aislado como un subproducto de la reacción de N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida y TBAF usando un procedimiento similar al ejemplo 11 en el documento de los Estados Unidos con número de serie

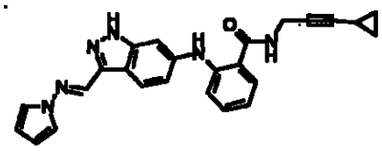
09/609.335, presentado el 30 de junio de 2.000, incorporado por este medio en su totalidad para todos los propósitos. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,19 (1H, s ancho), 10,00 (1H, s), 9,13 (1H, s), 8,37 (1H, d, J = 8,7 Hz), 8,06 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,75 (1H, s), 7,64 (2H, t, J = 2,3 Hz), 7,54 (2H, m), 7,35 (1H, dd, J = 1,9, 8,7 Hz), 6,99 (1H, m), 6,33 (2H, t, J = 2.3 Hz), 5,89 (2H, s), 3,68 (2H, t, J = 8,1 Hz), 0,94 (2H, t, J = 8,1 Hz), 0,00 (9H, s).

Ejemplo 54: N-(3-ciclopropil-prop-2-inil)-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



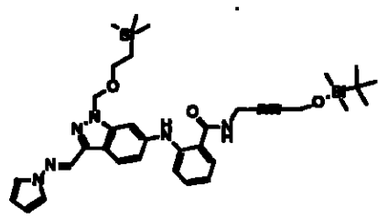
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y 3-ciclopropil-prop-2-inilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 9,93 (1H, s), 8,99 (1H, s), 8,95 (1H, d, J = 5,6 Hz), 8,20 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,68 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,51 (4H, m), 7,37 (1H, t, J = 6,8 Hz), 7,14 (1H, d, J = 9,0 Hz), 6,91 (1H, t, J = 7,5 Hz), 6,21 (2H, t, J = 2,3 Hz), 5,74 (2H, s), 4,00 (2H, dd, J = 2,0, 5,6 Hz), 3,55 (2H, t, J = 7,9 Hz), 1,26 (1H, m), 0,82 (2H, t, J = 7,9 Hz), 0,72 (2H, m), 0,54 (2H, m), -0,12 (9H, s).

Ejemplo 55: N-(3-ciclopropil-prop-2-inil)-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



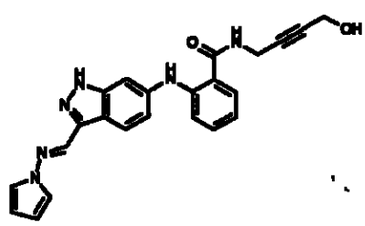
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 11 en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 09/609.335, archivado el 30 de junio de 2.000, incorporada como referencia en su totalidad para todos los propósitos, excepto en que N-(3-ciclopropil-prop-2-inil)-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida se usó en lugar de N-metil-N-[3-estiril-1-[(2-trimetil-silanil)-etoximetil]-1H-indazol-6-il}-benceno-1,3-diamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,29 (1H, s), 9,83 (1H, s), 8,98 (1H, s), 8,95 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,19 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,68 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,52 (2H, t, J = 2,3 Hz), 7,43 (2H, m), 7,29 (1H, s), 7,07 (1H, dd, J = 1,9, 8,7 Hz), 6,91 (1H, t, J = 7,4 Hz), 6,21 (2H, t, J = 2.3 Hz), 4,01 (2H, dd, J = 1,7, 5,5 Hz), 1,27 (1H, m), 0,73 (2H, m), 0,55 (2H, m). *Anal.* Calcd. para $C_{25}H_{22}N_6O$ · 0,05 hexanos · 0,30 H_2O: C, 70,31; H, 5,43; N, 19,45. Se encontró: C, 70,63; H, 5,38; N, 19,18.

Ejemplo 56: N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y 4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 10,04 (1H, s), 9,16 (1H, t, J = 5,3 Hz), 9,10 (1H, s), 8,31 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,78 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,67 (4H, m), 7,49 (1H, t, J = 8,5 Hz), 7,24 (1H, dd, J =1,7, 8,7 Hz), 7,03 (1H, t, J = 7,4 Hz), 6,33 (2H, t, J = 2.3 Hz), 5,85 (2H, s), 4,83 (2H, s), 4,19 (2H, d, J = 5,5 Hz), 3,66 (2H, t, J = 7,9 Hz), 0,94 (2H, m), 0,89 (9H, s), 0,13 (6H, s), 0,00 (9H, s).

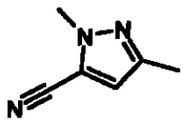
Ejemplo 57: N-(4-hidroxi-but-2-inil)-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 11 en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 09/609.335, presentada el 30 de junio de 2.000, incorporada como referencia en su

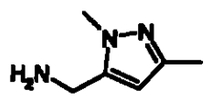
totalidad para todos los propósitos, excepto en que N-[4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-but-2-inil]-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida se usó en lugar de N-metil-N-{3-estiril-1-[2-trimetil-silanil)-etoximetil]-1H-indazol-6-il}-benceno-1,3-diamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,30 (1H, s), 9,87 (1H, s), 9,04 (1H, t, J = 5,3), 8,99 (1H, s), 8,19 (1H, d, J = 8,5 Hz), 7,70 (1H, d, J = 7,3 Hz), 7,46 (4H, s), 7,31 (1H, m), 7,08 (1H, dd, J = 1,7, 8,7 Hz), 6,91 (1H, t, J = 7,3 Hz), 6,21 (2H, t, J = 2.1 Hz), 5,14 (1H, t, J = 5,8 Hz), 4,10 (2H, d, J = 5,5 Hz), 4,06 (2H, d, J = 5,8 Hz). *Anal.* Calcd. para $C_{23}H_{20}N_6O_2 \cdot 0{,}35$ hexanos $\cdot 0{,}20\ H_2O$: C, 67,45; H, 5,86; N, 18,81. Se encontró: C, 67,70; H, 5,73; N, 18,56.

Ejemplo 58: 2,5-dimetil-2H-pirazol-3-carbonitrilo



2,5-dimetil-2H-pirazol-3-carbonitrilo se preparó a partir de 1,3-dimetilpirazol-5-carboxilato de etilo de acuerdo con los procedimientos publicados para el 1-metil-pirazol-5-carbonitrilo por Castellanos, María y Montserrat, Llinas;JCS Perkins Trans I (1985) 1209-1215. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6,52 (1H, s), 3,96 (3H, s), 2,27 (3H, s).

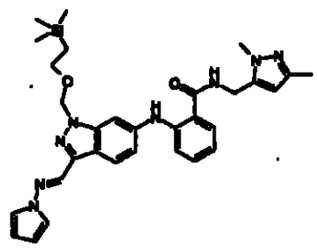
Ejemplo 59: C-(2,5-dimetil-2H-pirazol-3-il)-metilamina



Una suspensión de 2,5-dimetil-2H-pirazol-3-carbonitrilo (654 mg, 5,4

mmol) y 10% de paladio sobre carbono (200 mg) en etanol (15 ml) se sacudió en un aparato Parr de hidrogenación bajo 45 psi (310.275 kPa) de H_2 durante 17 horas. La mezcla se filtró a través de celita y el filtrado se concentró bajo presión reducida para dar 608 mg de un aceite el cual se usó sin ninguna purificación adicional. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 5,19 (1H, s), 3,81, 3,73 (2H, 2s), 3,75 (3H, s), 2,21 (3H, s).

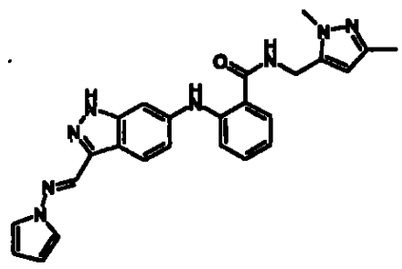
Ejemplo 60: *N*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-ilmetil)-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y *C*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-il)-metilamina. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 9,56 (1H, s), 8,68 (1H, s), 8,30 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,49 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,43 (1H, dd, J = 7,9, 1,5 Hz), 7,36-7,31 (2H, m), 7,23 (2H, t, J = 2,6 Hz), 7,17 (1H, dd, J = 8,7, 1,9 Hz), 6,83 (1H, t, J = 7,2 Hz), 6,32 (1H, ta), 6,29 (2H, t, J = 2,3 Hz), 6,01 (1H, s), 5,67 (2H, s), 4,61 (2H, d, J = 5,6 Hz), 3,60 (3H, s), 3,58 (2H, t, J = 8,3 Hz), 2,22 (3H, s), 0,90 (2H, t, J = 8,7 Hz), 0,06 (9H, s).

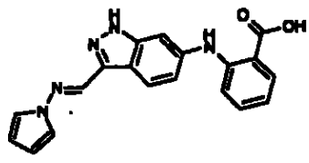
Ejemplo 61: *N*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-ilmetil)-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-

1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida



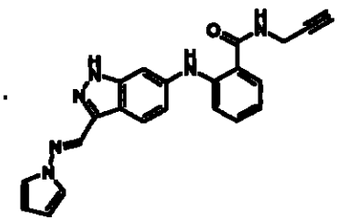
Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 11 en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 09/609.335, presentada el 30 de junio de 2.000, incorporada como referencia en su totalidad para todos los propósitos, excepto en que *N*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-ilmetil)-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida se usó en lugar de N-metil-N-{3-estiril-1-[(2-trimetil-silanil)-etoximetil]-1H-indazol-6-il}-benceno-1,3-diamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,27 (1H, s), 9,72 (1H, s), 9,05 (1H, t, J = 5,3 Hz), 8,97 (1H, s), 8,16 (1H, dd, J = 8,7 Hz), 7,68 (1H, dd, J = 8,3, 1,9 Hz), 7,50 (2H, t, J = 2,6 Hz), 7,46-7,38 (2H, m), 7,25 (1H, s), 7,05 (1H, dd, J = 8,7, 1,9 Hz), 6,91 (1H, t, J = 6,80 Hz), 6,20 (2H, t, J = 2,3 Hz), 5,91 (1H, s), 4,43 (2H, d, J = 5,6 Hz), 3,71 (3H, s), 2,04 (3H, s).

Ejemplo 62: Ácido 2-[3-(Pirrol-1-iliminometil)-1H-indazol-6-ylamino]-benzoico



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 11 en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 09/609.335, presentada el 30 de junio de 2.000, incorporada como referencia en su totalidad para todos los propósitos, excepto en que se usa ácido 2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico en lugar de N-metil-N-[3-estiril-1-[(2-trimetil-silanil)-etoximetil]-1H-indazol-6-il}-benceno-1,3-diamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 13,12 (1H, s), 12,70 (1H, s), 8,94 (1H, s), 8,10 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,91 (1H, dd, J = 1,7, 7,7 Hz), 7,50 (2H, t, J = 2,3 Hz), 7,36 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,27 (1H, d, J = 1,5 Hz), 7,16 (1H, t, J = 7,5 Hz), 6,94 (1H, dd, J = 1,7, 8,7 Hz), 6,68 (1H, t, J = 7,5 Hz), 6,19 (2H, t, J = 2,3 Hz).

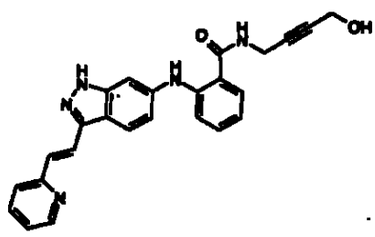
Ejemplo 63: N-prop-2-inil-2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de ácido 2-[3-(pirrol-1-iliminometil)-1H-indazol-6-ilamino]-benzoico y propargilamina. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 13,30 (1H, s), 9,82 (1H, s), 9,04 (1H, t, J = 5,6 Hz), 8,98 (1H, s), 8,19 (1H,

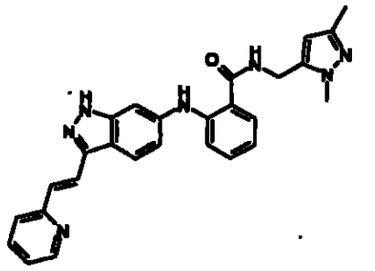
d, J = 8,6 Hz), 7,69 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,45 (4H, m), 7,31 (1H, s), 7,08 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,91 (1H, t, J = 7,6 Hz), 6,21 (2H, s), 4,05 (2H, s), 3,13 (1H, s). *Anal.* Calcd. para $C_{22}H_{18}N_6O \cdot 0{,}40\ H_2O \cdot 0{,}05$ hexanos: C, 67,97; H, 5,01; N, 21,33. Se encontró: C, 67,91; H, 4,78; N, 21,00.

Ejemplo 64: N-(4-hidroxi-but-2-inil)-2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de 2-[3-[2-(piridin-2-il-vinil]-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzoato de tetrabutilamonio y 4-amino-but-2-in-1-ol. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,95 (1H, s), 9,84 (1H, s), 9,02 (1H, t, J = 5,6 Hz), 8,59 (1H, d, J = 4,9 Hz), 8,08 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,90 (1H, d, J = 16,2 Hz), 7,80 (1H, t, J = 7,2 Hz), 7,70-7,64 (2H, m), 7,51 (1H, d, J = 16,2 Hz), 7,45-7,36 (2H, m), 7,27-7,24 (2H, m), 7,02 (1H, d, J = 9,0 Hz), 6,88 (1H, t, J = 7,2 Hz), 5,13 (1H, t, J = 5,6 Hz), 4,10-4,04 (4H, m).

Ejemplo 65: *N*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-ilmetil)-2-[3-(2-piridin-2-il-vinil)-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzamida



Preparado de una forma similar a la descrita para el ejemplo 6 anteriormente en este documento, excepto en el uso de 2-[3-[2-piridin-2-il-vinil]-1*H*-indazol-6-ilamino]-benzoato de tetrabutilamonio y *C*-(2,5-dimetil-2*H*-pirazol-3-il)-metilamina. ^{1}H NMR (DMSO- d_6) δ 12,93 (1H, s), 9,70 (1H, s), 9,04 (1H, ta), 8,58 (1H, d, J = 4,0 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8,8 Hz), 7,88 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,79 (1H, t, J = 8,6 Hz), 7,71-7,64 (2H, m), 7,50 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,44-7,39 (2H, m), 7,28-7,23 (2H, m), 7,00 (1H, d, J = 8,8 Hz), 6,90 (1H, t, J = 8,0 Hz), 5,91 (1H, s), 4,43 (2H, d, J = 5,5 Hz), 3,71 (3H, s), 2,04 (3H, s).

Las actividades de los compuestos puestos como ejemplos descritos anteriormente en este documento pueden ensayarse usando los ensayos descritos más adelante en este documento.

PRUEBA BIOLÓGICA: ENSAYOS ENZIMÁTICOS

La estimulación de la proliferación celular mediante factores de crecimiento tales como VEFG, FGF y otros depende de su inducción de autofosforilación de cada una de sus respectivas tirosinaquinasas de los receptores. Por lo tanto, la capacidad de un inhibidor de proteinquinasa para bloquear la autofosforilación se puede medir mediante la inhibición de sustratos de péptidos. Para medir la actividad de inhibición de proteinquinasas de los compuestos, se fabricaron las siguientes construcciones.

Construcción VEGF-R2 para ensayo. Esta construcción determina la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la actividad tirosinaquinasa.

Una construcción (VEGF-R2Δ50) del dominio citosólico del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF-R2) que carece de 50 restos centrales de los 68 restos del dominio de inserción de quinasa se expresó en un sistema de células de baculovirus/insecto. De los 1356 restos de VEGF-R2 de longitud completa, VEGF-R2Δ50 contiene los restos 806 – 939 y 990 – 1171, y también una mutación puntual (E990V) en el dominio de inserción de quinasa relativo a VEGF-R2 de tipo salvaje. La autofosforilación de la construcción purificada se realizó mediante la incubación de la enzima a una concentración de 4 μM en presencia de ATP 3 mM y $MgCl_2$ 40 mM en HEPES 100 mM, pH 7,5, que contenía 5% de glicerol y DTT 5 mM, a 4°C durante 2 horas. Después de autofosforilación, se ha mostrado que esta construcción posee actividad catalítica esencialmente equivalente a la construcción del dominio quinasa autofosforilada de tipo salvaje. Véase Parast y col., *Biochemistry*, 37, 16788 – 16801 (1998).

Construcción FGF-R1 para ensayo: El dominio quinasa intracelular de FGF-R1 se expresó usando el sistema de expresión del vector de baculovirus partiendo del resto de metionina 456 endógeno al de glutamato 766, según el sistema de numeración de restos de Mohammadi y col., *Mol. Cell. Biol.*, 16, 977 – 989 (1996). Además, la construcción también tiene las siguientes 3 sustituciones de aminoácidos L457V, C488A y C584S.

Construcción LCK para ensayo: La tirosina quinasa LCK se expresó en células de insecto como una supresión N-terminal comenzando en el resto aminoácido 223 hasta el final de la proteína en el resto 509, con las siguientes dos sustituciones de aminoácidos en el extremo N: P233M y C224D.

Construcción CHK1 para ensayo: CHK1 humana de longitud completa

(abreviadamente FL-CHK1) marcada con His en el C terminal se expresó usando el sistema celular de baculovirus/insecto. Contiene 6 restos de histidina (6 x marca His) en el extremo C terminal de la CHK1 humana de 476 aminoácidos. La proteína se purificó mediante técnicas cromatográficas convencionales.

Construcción CDK2/ciclina A para ensayo: La CDK2 se purificó usando metodología publicada (Rosenblatt y col., *J. Mol. Biol.*, 230, 1317 – 1319 (1993)) de células de insectos que se habían infectado con un vector de expresión de baculovirus. La ciclina A se purificó a partir de células de *E. coli* que expresan ciclina A recombinante de longitud completa, y se generó una construcción de ciclina A truncada mediante proteolisis limitada y purificada como se ha descrito previamente (Jeffrey y col., *Nature*, 376, 313 – 320 (1995)).

Construcción CDK4/ciclina D para ensayo: un complejo de CDK4 humano y ciclina D3, o un complejo de ciclina D1 y una proteína de fusión de CDK4 humano y glutatión-S-transferasa (abreviadamente GST-CDK4), se purificó usando técnicas cromatográficas bioquímicas tradicionales a partir de células de insecto que se habían coinfectado con los correspondientes vectores de expresión de baculovirus.

Construcción FAK para ensayo: El dominio catalítico de FAK humana (FAKcd409) se expresó usando el sistema de expresión del vector de baculovirus. El dominio de 280 aminoácidos expresado comprende los restos de la metionina 409 hasta el glutamato 689. Existe una sustitución de un aminoácido (P410T) relativo al número de acceso L13616 de la secuencia publicada por Whithey, G. S. y col., *DNA Cell Biol*, 9, 823 – 30 (1993). La

proteína se purificó usando técnicas cromatográficas clásicas.

Construcción TIE-2 (TEK) para ensayo:

El dominio de tirosinaquinasa TIE-2 se expresó en células de insecto como una supresión en el N terminal comenzando desde el resto aminoácido 774 hasta el final de la proteína en el resto 1124. Esta construcción también lleva una mutación R774M, que sirve como el resto de metioniona iniciador de la traducción.

Ensayo VEGF-R2

Ensayo espectrofotométrico acoplado (FLVK-P)

La producción de ADP a partir de ATP que acompaña a la transferencia de fosforilo se acopló a la oxidación de NADH usando fosfoenolpiruvato (abreviadamente en inglés PEP) y un sistema que tiene piruvatoquinasa (abreviadamente en inglés PK) y lácticodeshidrogenasa (abreviadamente en inglés LDH). La oxidación de NADH se controló siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm (e_{340} = 6,22 cm^{-1} mM^{-1}) usando un espectrofotómetro Beckman DU 650. Las condiciones de ensayo para VEGF-R2Δ50 fosforilada (indicada como FLVK-P en las tablas más adelante) eran las siguientes: PEP 1 mM; NADH 250 µM; 50 unidades de LDH/ml; 20 unidades de PK/ml; DTT 5 mM; poli(E_4Y_1) 5,1 mM; ATP 1 mM; y $MgCl_2$ 25 mM en HEPES 200 mM, pH 7,5. Las condiciones de ensayo para VEGF-R2Δ50 no fosforilada (indicada como FLVK en las tablas) eran las siguientes; PEP 1 mM; NADH 250 µM; 50 unidades de LDH/ml; 20 unidades de PK/ml; DTT 5 mM; poli(E_4Y_1) 20 mM; ATP 3 mM; y $MgCl_2$ 60 mM y $MnCl_2$ 2 mM en HEPES 200 mM, pH 7,5. Los ensayos se iniciaron con enzima 5 a 40 nM. Los valores de K_i se determinaron midiendo la actividad enzimática en presencia de concentraciones variables de los

compuestos de ensayo. Los datos se analizaron usando software de cinética enzimática y Kaleidagraph.

Ensayo de ELISA

La formación de fosfogastrina se controló usando péptido (1 – 17) de gastrina biotinilada como sustrato. La fosfogastrina biotinilada se inmovilizó usando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina seguido de la detección usando anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado a peroxidasa de rábano rusticano. La actividad de la peroxidasa de rábano rusticano se controló usando la sal de diamonio de 2,2'-azino-di-[3-etilbenzatiazolina sulfonato(6)] (abreviadamente en inglés ABTS). Las soluciones de ensayo típicas contenían: péptido de gastrina biotinilada 2 μM; DTT 5 mM; ATP 20 μM; $MgCl_2$ 26 mM; y $MnCl_2$ 2 mM en HEPES 200 mM, pH 7,5. El ensayo se inició con VEGF-R2Δ50 fosforilado 0,8 nM. La actividad de peroxidasa de rábano rusticano se ensayó usando ABTS 10 mM. La reacción de peroxidasa de rábano rusticano se inactivó mediante la adición de ácido (H_2SO_4), seguido de la lectura de la absorbancia a 405 nm. Los valores de K_i se determinaron midiendo la actividad enzimática en presencia de concentraciones variables de los compuestos de ensayo. Los datos se analizaron usando software de cinética enzimática y Kaleidagraph.

Ensayo de FGF-R

El ensayo espectrofotométrico se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente para VEGF-R2, excepto por los siguientes cambios en concentración: FGF-R = 50 nM, ATP = 2 mM y poli(E4Y1) = 15 mM.

Ensayo de LCK

El ensayo espectrofotométrico se llevó a cabo como se ha descrito

anteriormente para VEGF-R2, excepto por los siguientes cambios en concentración: LCK = 60 nM, $MgCl_2$ = 0 mM, poli(E4Y1) = 20 mM.

Ensayo de CHK1

La producción de ADP a partir de ATP que acompaña a la transferencia de fosforilo al péptido de sustrato sintético Syntide-2 (PLARTLSVAGLPGKK) se acopló a la oxidación de NADH usando fosfoenolpiruvato (abreviadamente en inglés PEP) mediante las acciones de piruvatoquinasa (abreviadamente en inglés PK) y lácticodeshidrogenasa (abreviadamente en inglés LDH). La oxidación de NADH se controló siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm ($\varepsilon 340$ = 6,22 cm^{-1} mM^{-1}) usando un espectrofotómetro HP8452. Las soluciones de reacción típicas contenían: PEP 4 mM; NADH 0,15 mM; 28 unidades de LDH/ml; 16 unidades de PK/ml; DTT 3 mM; Syntide-2 0,125 mM; ATP 0,15 mM; $MgCl_2$ 25 mM en TRIS 50 mM, pH 7,5; y NaCl 400 mM. Los ensayos se iniciaron con FL-CHK1 10 nM. Los valores de K_i se determinaron midiendo la actividad enzimática inicial en presencia de concentraciones variables de los compuestos de ensayo. Los datos se analizaron usando software de cinética enzimática y Kaleidagraph.

Ensayos de CDK2/Ciclina A y CDK4/Ciclina D

La actividad quinasa dependiente de ciclina se midió cuantificando la incorporación dependiente del tiempo, catalizada enzimáticamente de fosfato radiactivo de [^{32}P]ATP en un fragmento recombinante de la proteína de retinoblastoma. Salvo que se indique otra cosa, los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen total de 50 µl, en presencia de HEPES 10 mM (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[ácido 2-etanosulfónico]) (pH 7,4), $MgCl_2$ 10 mM, trifosfato de adenosina (abreviadamente en inglés ATP) 25 µM, 1 mg/ml

de ovoalbúmina, 5 µg/ml de leupeptina, ditiotreitol 1 mM, β-glicerofosfato 10 mM, vanadato sódico 0,1 mM, fluoruro sódico 1 mM, ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético (abreviadamente en inglés EGTA) 2,5 mM, 2% (v/v) de dimetilsulfóxido y 0,03 – 0,2 µCi[^{32}P]ATP. Del sustrato (0,3 – 0,5 µg) se purificó un fragmento de la proteína recombinante del retinoblastoma (abreviadamente Rb) (restos 386 – 928 de la proteína de retinoblastoma nativa; 62,3 kDa, que contiene la mayoría de los sitios de fosforilación encontrados en la proteína nativa de 106 kDa, así como un marcador de seis restos de histidina para facilitar la purificación). Las reacciones se iniciaron con CDK2 (complejo CDK2/ciclina A 150 nM) o CDK4 (complejo CDK4/ciclina D3 50 nM), se incubó a 30ºC, y finalizó después de 20 minutos mediante la adición de ácido etilendiaminotetraacético (abreviadamente en inglés EDTA) 250 mM. Después el sustrato fosforilado se capturó sobre una membrana de nitrocelulosa usando un colector de filtración de 96 pocillos y la radiactividad no incorporada se retiró mediante lavado repetido con ácido fosfórico al 0,85%. La radiactividad se cuantificó exponiendo las membranas de nitrocelulosa secas a un formador de imágenes por fosforescencia. Los valores aparentes de K_i se midieron ensayando la actividad enzimática en presencia de diferentes concentraciones de compuesto y restando la radiactividad de fondo medida en ausencia de enzima. Los parámetros cinéticos (kcat, Km para ATP) se midieron para cada enzima en las condiciones de ensayo habituales determinando la dependencia de las cantidades iniciales en la concentración de ATP. Los datos se ajustaron a una ecuación para inhibición competitiva usando Kaleidagraph (Software de Synergy), o se ajustaron a una ecuación para inhibición de unión estrecha competitiva usando el software KineTic (BioKin, Ltd.). Los valores medidos de

K_i para inhibidores conocidos frente a CDK4 y CDK2 concordaban con los valores de CI_{50} publicados. La actividad específica de CDK4 era la misma si se complejaba a la ciclina D3 de longitud completa o a la construcción de ciclina D3 truncada; ambos complejos también producían valores muy similares de K_i para inhibidores seleccionados.

Ensayos de FAK

FAK HTS utilizaba el ensayo de polarización por fluorescencia proporcionado por LJL Biosystems. La reacción de quinasa contenía: Hepes 100 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 10 mM;; DTT 1 mM, ATP 1 mM y poli Glu – Tyr 1 mg/ml (4:1). La reacción se inicia mediante la adición de FAKcd409 5 nM. La reacción se terminó mediante la adición de EDTA seguido de la adición de péptido marcado con flúor y anticuerpo anti-fosfotirosina, ambos proporcionados por LJL Biosystems. Los resultados de la inhibición se leen en un detector Analyst (LJL).

Ensayos espectrofotométrico de TIE-2

La producción catalizada por quinasa de ADP a partir de ATP que acompaña la transferencia de fosforilo al copolímero aleatorio poli(Glu_4Tyr) se acopló a la oxidación de NADH mediante las actividades de piruvatoquinasa (abreviadamente en inglés PK) y lactatodeshidrogenasa (abreviadamente LDH). La conversión de NADH a NAD^+ se controló mediante la disminución en absorbancia a 340 nm (ε = 6,22 cm^{-1} mM^{-1}) usando un espectrofotómetro Beckman DU650. Las soluciones de reacción típicas contenían: fosfoenolpiruvato 1 mM; NADH 0,24 mM; $MgCl_2$ 40 mM, DTT 5 mM, 2,9 mg/ml de poli(Glu_4Tyr), ATP 0,5 mM, 15 unidades/ml de PK, 15 unidades/ml de LDH en HEPES 100 mM, PH 7,5. Los ensayos se iniciaron con la adición de Tie-2

fosforilado 4 a 12 nM (aminoácidos 775 – 1122). El porcentaje de inhibición se determinó por triplicado a un nivel de inhibidor de 1 µM.

Ensayo de TIE-2 DELFIA

La formación de fosfotirosina se controló usando el péptido p34cdc2 biotinilado (aminoácidos 6 – 20 = KVEKIGEGTYGVVYK) como sustrato. El péptido biotinilado se inmovilizó usando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con NeutrAvidin™ seguido de detección usando anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20) conjugado a quelato de europio N1. Las soluciones de ensayo típicas contenían: péptido p34cdc2 biotinilado 1 µM, ATP 150 µM, $MgCl_2$ 5 mM; DTT 1 mM, 0,01% de BSA, 5% de glicerol, 2% de DMSO, HEPES 25 mM pH 7,5. El ensayó se inició en la placa de NeutrAvidin con dominio intracelular de TIE2 50 nM. La reacción de quinasa se terminó con EDTA 50 mM. Después las placas se lavaron, y se añadió anticuerpo de europio. Después de la incubación, se lavaron otra vez y se añadió solución de potenciación DELFIA™. Las placas se leyeron en posiciones patrones de resolución con el tiempo de Europio (ex 340 nm, em 615 nm, retardo 400 µ segundos, ventana 400 µ segundos). El porcentaje de inhibición se calculó con referencia a los pocillos intraplaca a los que se había añadido DMSO en lugar del compuesto en DMSO, restándose el fondo tanto del experimento como del control con referencia a un pocillo intraplaca al que se había añadido EDTA antes de la adición de enzima.

Ensayo de proliferación de HUVEC

Este ensayo determina la capacidad de un compuesto de ensayo de inhibir la proliferación estimulada por el factor de crecimiento de células endoteliales de la vena umbilical humana (abreviadamente en inglés "HUVEC").

Las células HUVEC (3 – 4 pases, Clonetics, Corp) se descongelaron en medio de cultivo EGM2 (Clonetics Corp) en matraces T75. El medio EGM2 reciente se añadió a los matraces 24 horas después. Cuatro o cinco días más tarde, se expusieron las células a otro medio de cultivo (medio F12K suplementado con 10% de suero fetal bovino (abreviadamente en inglés FBS), 60 µg/ml de suplemento de crecimiento de células endoteliales (abreviadamente en inglés ECGS), y 0,1 mg/ml de heparina). Las células HUVEC en crecimiento exponencial se usaron en experimentos más tarde. Se sembraron entre diez y doce mil células de HUVEC en placas de 96 pocillos en 100 µl de medio de cultivo enriquecido (descrito anteriormente). Se dejó que las células se unieran durante 24 horas en este medio. Después el medio se retiró mediante aspiración y se añadieron 105 µl de medio de inanición (F12K + 1% de FBS) a cada pocillo. Después de 24 horas, se añadieron 15 µl de agente de ensayo disuelto en 1% de DMSO en medio de inanición o este vehículo solo en cada pocillo de tratamiento; la concentración final en DMSO era de 0,1%. Una hora más tarde se añadieron a todos los pocillos 30 µl de VEGF (30 ng/ml) en medio de inanición excepto a los que contenían controles sin tratar; la concentración final de VEGF era 6 ng/ml. La proliferación celular se cuantificó 72 horas más tarde mediante reducción del colorante MTT, tiempo en el que las células se expusieron durante 4 horas a MTT (Promega Corp.). La reducción del colorante se detuvo mediante la adición de una solución de detención (Promega Corp.) y se determinó la absorbancia a λ de 595 en un espectrofotómetro lector de placas de 96 pocillos.

Los valores de CI_{50} se calcularon mediante el ajuste de curva a la respuesta de A^{595} a diversas concentraciones del agente de ensayo;

típicamente, se emplearon siete concentraciones separadas semilogarítmicamente, con pocillos triplicados a cada concentración. Para el análisis de las placas de la biblioteca de los compuestos, se emplearon una o dos concentraciones (un pocillo por concentración), y se calculó el % de inhibición mediante la siguiente fórmula:

% de inhibición = (control – ensayo) ÷ (control – inanición)

donde

control = A^{595} cuando VEGF está presente sin agente de ensayo

ensayo = A^{595} cuando VEGF está presente con agente de ensayo

inanición = A^{595} cuando VEGF y el agente de ensayo están ambos ausentes.

Ensayo de PK en ratones

Se analizó la farmacocinética (por ejemplo, absorción y eliminación) de fármacos en ratones usando el siguiente experimento. Los compuestos de ensayo se formularon en forma de una solución o suspensión en un vehículo 30:70 (PEG 400: H_2O acidificada) o en forma de una suspensión en 0,5% de CMC. Ésta se administró oralmente (abreviadamente p. o.) e intraperitonealmente (abreviadamente i. p.) a dosis variables a dos grupos distintos (n = 4) de hembras de ratones B6. Las muestras de sangre se recogieron mediante un sangrado orbital en los instantes: 0 horas (antes de la dosis), 0,5 horas, 1,0 horas, 2,0 horas y 4,0 horas y 7,0 horas después de la dosis. Se obtuvo plasma de cada muestra mediante centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. El compuesto de ensayo se extrajo del plasma mediante un procedimiento de precipitación de proteínas orgánicas. Para cada tiempo de sangrado se combinaron 50 µl de plasma con 1,0 ml de acetonitrilo, se agitó en

un aparato vortex durante 2 minutos y después se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos para precipitar la proteína y se extrajo el compuesto de ensayo. A continuación, el sobrenadante en acetonitrilo (el extracto que contenía el compuesto de ensayo) se vertió en tubos de ensayo nuevos y se evaporó en una placa caliente (25ºC) en una corriente de gas N_2. A cada tubo que contenía el extracto del compuesto de ensayo seco se añadieron 125 µl de fase móvil (60:40, $NH_4H_2PO_4$ 0,025 M + 2,5 ml/l de TEA:acetonitrilo). Se resuspendió el compuesto de ensayo en la fase móvil agitando en un aparato vortex y se retiró más proteína mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos. Se vertió cada muestra en un vial de HPLC para el análisis del compuesto de ensayo en un HPLC de serie Hewlett Packard 1100 con detección UV. De cada muestra se inyectaron 95 µl en una columna de 150 x 3,2 mm, C-18 de fase inversa Phenomenex-Prodigy y se eluyó con 45 – 50% de gradiente de acetonitrilo llevándolo a cabo durante 10 minutos. Las concentraciones en plasma del compuesto de ensayo (µg/ml) se determinaron mediante comparación con una curva patrón (área del pico frente concentración µg/ml) usando concentraciones conocidas del compuesto de ensayo extraído de muestras de plasma de la manera descrita anteriormente. Junto con los patrones y no conocidos, tres grupos (n = 4) de controles de calidad (0,25 µg/ml, 1,5 µg/ml, y 7,5 µg/ml) se llevaron a cabo para asegurar la consistencia del análisis. La curva patrón tenía un valor de $R^2 > 0,99$ y los controles de calidad estaban todos entre 10% de sus valores esperados. Las muestras de ensayo cuantificadas se representaron para la exposición visual usando un software de Kalidagraph y se determinaron sus parámetros farmacocinéticos usando el software WIN NONLIN. El ejemplo 1(a) proporcionó

los siguientes resultados: 0,69 (pK de ratones, AUC, ip, µg-h/ml); 0,33 (pK de ratones, AUC, po, µg-h/ml).

Ensayo de fosforilación de KDR (VEGFR2) en células PAE - KDR

Este ensayo determina la capacidad de un compuesto de ensayo de inhibir la autofosforilación de KDR en células endoteliales (PAE)-KDR de aorta porcina. Las células de PAE que sobreexpresan KDR de tipo humano se usaron en este ensayo. Las células se cultivaron en medio F12 de Ham suplementado con 10% de suero fetal bovino (abreviadamente en inglés FBS) y 400 µg /ml de G418. Se sembraron treinta mil células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en 75 µl de medio de crecimiento y se permitió que se adhirieran durante 6 horas a 37°C. Después las células se expusieron al medio de inanición (medio F12 de Ham suplementado con 0,1% de FBS) durante 16 horas. Después de concluir el período de inanición, se añadieron 10 µl de agente de ensayo en 5% de DMSO en medio de inanición a los pocillos de ensayo y se añadieron 10 µl del vehículo (5% de DMSO en medio de inanición) a los pocillos de control. La concentración final de DMSO en cada pocillo era 0,5%. Se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora y después las células se estimularon con 500 ng/ml de VEGF (comercialmente disponible de R & D System) en presencia de Na_3VO_4 2 mM durante 8 minutos. Se lavaron las células una vez con Na_3VO_4 1 mM en HBSS y se lisaron añadiendo 50 µl por pocillo de tampón de lisis. Después se añadieron cien µl de tampón de dilución a cada pocillo y el lisado celular diluido se transfirió a una placa de 96 pocillos recubierta con cabra anti-conejo (comercialmente disponible de Pierce) que se recubrió previamente con anticuerpo conejo anti humano anti-flk-1 C-20 (comercialmente disponible de Santa Cruz). Se incubaron las placas a

temperatura ambiente durante 2 horas y se lavaron siete veces con 1% de Tween 20 en PBS. Se diluyó HRP-PY20 (comercialmente disponible de Santa Cruz) y se añadió a la placa para incubación durante 30 minutos. Después las placas se lavaron otra vez y se añadió sustrato de peroxidasa de TMB (comercialmente disponible de Kirkegaard & Perry) para una incubación de 10 minutos. Cien µl de 0,09 N de H_2SO_4 se añadieron a cada pocillo de las placas de 96 pocillos para detener la reacción. Se valoró el estado de fosforilación mediante lectura en espectrofotómetro a 450 nm. Los valores de CI_{50} se calcularon mediante ajuste a una curva usando un análisis de cuatro parámetros.

Ensayo de fosforilación de PAE-PDGFRβ en células PAE - PDGFRB

Este ensayo determina la capacidad de un compuesto de ensayo de inhibir la autofosforilación de PDGFRβ en células endoteliales (PAE)- PDGFRβ de aorta porcina. Las células de PAE que sobreexpresan PDGFRβ humano se usaron en este ensayo. Las células se cultivaron en medio F12 de Ham suplementado con 10% de suero fetal bovino (abreviadamente en inglés FBS) y 400 µg /ml de G418. Se sembraron veinte mil células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en 50 µl de medio de crecimiento y se permitió que se adhirieran durante 6 horas a 37°C. Después las células se expusieron al medio de inanición (medio F12 de Ham suplementado con 0,1% de FBS) durante 16 horas. Después de concluir el período de inanición, se añadieron 10 µl de agente de ensayo en 5% de DMSO en medio de inanición a los pocillos de ensayo y se añadieron 10 µl del vehículo (5% de DMSO en medio de inanición) a los pocillos de control. La concentración final de DMSO en cada pocillo era 0,5%. Se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora y después las células se

estimularon con 1 µg/ml de PDGF-BB (R & D System) en presencia de Na_3VO_4 2 mM durante 8 minutos. Se lavaron las células una vez con Na_3VO_4 1 mM en HBSS y se lisaron añadiendo 50 µl por pocillo de tampón de lisis. Después se añadieron cien µl de tampón de dilución a cada pocillo y el lisado celular diluido se transfirió a una placa de 96 pocillos recubierta con cabra anti-conejo (Pierce), que se recubrió previamente con anticuerpo conejo anti humano PDGFRβ (Santa Cruz). Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 horas y se lavaron siete veces con 1% de Tween 20 en PBS. Se diluyó HPR-PY20 (Santa Cruz) y se añadió a la placa para incubación durante 30 minutos. Después las placas se lavaron otra vez y se añadió sustrato de peroxidasa de TMB (Kirkegaard & Perry) para una incubación de 10 minutos. Cien µl de 0,09 N de H_2SO_4 se añadieron a cada pocillo de las placas de 96 pocillos para detener la reacción. Se valoró el estado de fosforilación mediante lectura en espectrofotómetro a 450 nm. Los valores de CI_{50} se calcularon mediante ajuste a una curva usando un análisis de cuatro parámetros.

Ensayo de microsomas de hígado humano (abreviadamente en inglés HLM)

Se midió el metabolismo de los compuestos en microsomas de hígado humano mediante procedimientos de ensayo analítico por LC – MS como sigue. Primero, los microsomas de hígado humano (abreviadamente en inglés HLM) se descongelaron y se diluyeron hasta 5 mg/ml con tampón fosfato potásico 100 mM frío (KPO4). Cantidades adecuadas de KPO4, solución regeneradora de NADPH (que contenía B-NADP, glucosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y $MgCl_2$) y HLM se preincubaron en tubos de vidrio de 13 x 100 mm a 37°C durante 10 minutos (tres tubos por compuesto de ensayo – triplicado). El compuesto de ensayo (5 µM final) se añadió a cada tubo para

iniciar la reacción y se mezcló mediante agitación suave en un aparato vortex, seguido de incubación a 37°C. A t = 0, 2 h, se retiró una muestra de 250 µl de cada tubo de incubación a tubos separados de vidrio de 12 x 75 mm que contenían 1 ml de acetonitrilo frío con reserpina 0,05 µM. Se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 20 minutos para precipitar proteínas y sal (Beckman Allegra 6KR, S/N ALK98D06, nº 634). Se transfirió el sobrenadante a tubos de vidrio nuevos de 12 x 75 mm y se evaporaron mediante un evaporador a vacío centrífugo Speed – Vac. Se reconstituyeron las muestras en 200 µl de 0,1% de ácido fórmico/acetonitrilo (90:10) y se agitó en un aparato vortex vigorosamente para disolver. Después las muestras se transfirieron a tubos de microcentrífuga de polipropileno separados y se centrifugó a 14000 x g durante 10 minutos (Fisher Micro 14, S/N M0017580). Para cada réplica (nº 1 – 3) en cada instante (0 y 2 h) se reunió una muestra alícuota de cada compuesto de ensayo en una sola inserción de vial de HPLC (un total de 6 muestras) para análisis de LC – MS, que se describe más adelante.

Las muestras de compuesto reunidas se inyectaron en el sistema de LC – MS, compuesto de un HPLC de conjunto de diodos Hewlett – Packard HP 1100 y un espectrómetro de masas Micromass Quatro II triple cuádruple que funcionaba en modo de SIR de electropulverización positiva (programado para explorar específicamente para el ión molecular de cada compuesto de ensayo). Cada pico de compuesto de ensayo se integró en cada instante. Para cada compuesto, se promedió el área del pico en cada instante (n = 3), y el valor medio de este área del pico en 2 h se dividió por el valor medio del área del pico en el instante 0 horas para obtener el porcentaje del compuesto de ensayo a las 2 h.

Los resultados del ensayo de los compuestos usando diversos ensayos se resumen en la tabla más adelante, donde una anotación de "% @" indica el porcentaje de inhibición a la concentración establecida, los valores "*" representan K_i (nM) o % de inhibición a una concentración de compuesto de 1 µM para * o 50 nM para **, salvo que se indique otra cosa. "NE" indica una inhibición no significativa o no ensayada.

Tabla 1

Nº de ejemplo	K_i % de inh. @ 50 nM de FLVK	FLVK-P**	% de inh. @ 1 µM de LckP*	% de inh. @ 1 µM de FGF-P	CI50 (nM) de HUVEC	CI50 (nM) de HUVEC + albúmina	% restante (HLM)	CI50 nM de autofos. de PAE PDGFR	Media de CI50 nM de PAE KDR	Media de CI50 (nM) de bFGF Huvec
3 (a)	98	NE	30	99	12,7	NE	NE	NE	NE	NE
3 (b)	98	NE	27	96	5,7	NE	84 @ 2h	NE	NE	NE
3 (c)	91	NE	9	83	0,43	9,2	46@0,5h	NE	NE	NE
3 (d)	89	NE	11	80	0,4	7,5	68 @ 2h	3,5	NE	147
3 (f)	95	NE	41	60	NE	> 100	NE	NE	NE	NE
3 (g)	95	NE	28	72	1,1	NE	72@0,5h	NE	NE	NE
3 (h)	96	NE	37	85	1,6	NE	75@0,5h	0,63	NE	NE
3 (i)	88	NE	22	45	0,2	NE	NE	1,9	NE	1000

Continuación de tabla 1

Nº de ejemplo	K_i % de inh. @ 50 nM de FLVK	FLVK-P**	% de inh. @ 1 µM de Lck P*	% de inh. @ 1 µM de FGF-P	CI50 (nM) de HUVEC	CI50 (nM) de HUVEC + albúmina	% restante (HLM)	CI50 nM de autofos. de PAE PDGFR	Media de CI50 (nM) de PAE KDR	Media de CI50 (nM) de bFGF Huvec
3 (j)	80	NE	17	43	1,7	NE	65@0,5h	4,7	NE	NE
3 (k)	74	NE	19	36	0,8	NE	75@0,5h	5	NE	1000
3 (q)	47	NE	7	31	5	NE	82@0,5h	5,2	NE	NE
2 (h)	84	NE	NE	75	1,6	NE	74@0,5h	2,8	NE	70
1 (k)	27	NE	NE	12	> 10	NE	NE	NE	NE	NE
2 (g)	83	NE	NE	79	0,71	NE	85@0,5h	10,5	NE	173
64	94	NE	NE	39	0,15	NE	66@0,5h	5,5	NE	1250
65	3,11 nM	NE	NE	NE	3,4	NE	88@0,5h	5,8	NE	NE
61	65	NE	NE	14	6,5	NE	NE	NE	NE	662
41	45	NE	NE	11	6,4	NE	NE	NE	NE	3775
51	82	NE	NE	52	NE	NE	NE	NE	NE	NE
15	84	NE	NE	29	1,5	NE	NE	12,3	NE	1613
36	95	0,3 nM	NE	69	1,67	NE	NE	NE	1,62	935
13	80	NE	NE	63	NE	NE	NE	6	NE	NE
18	94	NE	NE	59%	NE	NE	NE	NE	NE	1882
20	91	NE	NE	35%	0,084	NE	NE	NE	NE	NE
37	90	NE	NE	45	NE	NE	NE	NE	0,76	NE
38	75	NE	NE	NE	NE	0,68	NE	2	NE	NE

Continuación de tabla 1

Nº de ejemplo	K_i % de Inh. @ 50 nM de FLVK	FLVK-P**	% de inh. @ 1 µM de Lck P*	% de Inh. @ 1 µM de FGF-P	CI50 (nM) de HUVEC	CI50 (nM) de HUVEC + albúmina	% restante (HLM)	CI50 (nM) de autofos. de PAE PDGFR	Media de CI50 (nM) de PAE KDR	Media de CI50 (nM) de bFGF Huvec
39	96	NE	NE	76%	NE	NE	NE	4,7	NE	NE
32	78	NE	NE	70%	0,61	NE	97@0,5h	0,5	NE	NE
55	97	NE	NE	67%	0,2	NE	NE	3,7	NE	NE
57	91	NE	NE	52%	< 1,8	NE	NE	1,3	NE	NE
63	85	NE	NE	63%	0,1	NE	NE	2,4	NE	NE
34	72	NE	NE	NE	NE	NE	NE	4,5	NE	NE
10	76	6,07	NE	38, 197nM	0,67	NE	80@0,5h	21	NE	NE
45	28	NE	NE	24	NE	NE	NE	NE	NE	NE
49	11	NE	NE	36	NE	NE	NE	NE	NE	NE
23	23	NE	NE	56	NE	NE	NE	40	NE	NE
25	64	NE	NE	13	3	NE	NE	NE	NE	NE

Ensayo *in vivo* de desarrollo vascular retinal en ratas neonatales

El desarrollo del vascular retinal en ratas se produce desde el día 1 postnatal hasta el día 14 postnatal (P1 – P14). Este procedimiento depende de la actividad de VEGF (J. Stone y col., *J. Neurosci.*, 15, 4738 (1995). El trabajo anterior ha demostrado que VEGF actúa también como un factor de supervivencia de los vasos de la retina durante el desarrollo vascular temprano

(Alon y col., *Nat. Med.*, 1, 1024 (1995)). Para valorar la capacidad de compuestos específicos para inhibir la actividad de VEGF *in vivo*, se formularon compuestos en un vehículo adecuado, habitualmente 50% de polietilenglicol, peso molecular medio de 400 daltons, y 50% de solución de sacarosa 300 mM en agua desionizada. Típicamente, dos microlitros (2 µl) de la solución de fármaco se inyectó en el vítreo medio del ojo de crías de ratas el día postnatal 8 ó 9. Seis días después de la inyección intravítrea se sacrificaron los animales y se diseccionaron las retinas libres del tejido ocular restante. Después las retinas aisladas se sometieron a un protocolo de tinción histoquímica que tiñe las células endoteliales específicamente (Lutty y McLeod, *Arch. Ophthalmol.*, 110, 267 (1992)), que revelan el grado de vascularización en la muestra del tejido. Después las retinas individuales se fijan en portaobjetos y se examinan para determinar el grado de vascularización. Los compuestos eficaces inhiben el desarrollo adicional de la vasculatura retinal e inducen una regresión de todos los vasos mayores en la retina. La cantidad de regresión vascular se usó para valorar la potencia relativa de los compuestos después de administración *in vivo*. La regresión vascular se gradúa en una escala subjetiva de uno a tres pluses, juzgándose un plus como aproximadamente 25 por ciento o menos de la regresión detectable, juzgándose que dos pluses son aproximadamente 25 – 75% de regresión y tres pluses dan retinas con casi regresión total (aproximadamente 75% o mayor).

Para análisis cuantitativo adicional de regresión, las imágenes de tinción de ADPasa, las retinas fijadas se capturaron con una cámara digital adjunta a un microscopio de disección. Después las imágenes retinales se importaron en un software de análisis de imágenes (Imagen Pro PLus 4.0, Media Cibernetics,

Silver Spring, MD). El software se empleó para determinar el porcentaje del área de la retina que contenía vasos teñidos. Este valor para el ojo experimental se comparaba con el medido para el vehículo inyectado, ojo contralateral del mismo animal. La reducción en el área vascular observada en el ojo que recibía el compuesto comparada con el ojo inyectado con vehículo se expresó después como el "porcentaje de regresión" para esa muestra. Los porcentajes de los valores de regresión se promediaron para grupos de 5 – 8 animales.

En muestras en las que la observación mediante el microscopio indicaban una regresión casi total, un valor del porcentaje de regresión de 65 – 70% se media habitualmente. Esto se debía a los depósitos de colorante en el interior de los pliegues de retina, pliegues que se inducían por el vehículo usado para inyección del fármaco. El software de análisis de imágenes interpretaba estos pliegues que contenían colorante como vasos. No se hizo ningún intento para corregir estos pliegues ya que variaban de ojo a ojo. De este modo, se observará que el porcentaje de los valores de regresión indicados resultan de una medición conservadora que exactamente clasifica los compuestos por orden, pero subestima su potencia absoluta.

Ensayo *in vivo* de desarrollo vascular retinal en modelo de ratas neonatales de retinopatía de prematurez

Un segundo modelo de neovascularización retinal dependiente de VEGF se empleó para evaluar las actividades de esta serie de compuestos. En este modelo (Penn y col., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*,36, 2063 (1995)), crías de ratas (n = 16) con su madre se situaron en una cámara controlada por ordenador que regula la concentración de oxígeno. Los animales se expusieron

durante 24 horas a una concentración de 50% de oxígeno seguido de 24 horas a una concentración de 10% de oxígeno. Este ciclo alternante de hiperoxia seguido de hipoxia se repite 7 veces después del cual se sacan los animales al aire ambiente (P14). Los compuestos se administran mediante inyección intravitreal tras sacarlos al aire ambiente y los animales se sacrificaron 6 días después (P20). Las retinas aisladas, seguidamente se aíslan, se tiñen, se fijan y se analizan como se ha detallado anteriormente en el modelo de desarrollo. La eficacia también se graduó como se describe para el modelo de desarrollo.

Los compuestos ejemplares descritos anteriormente se pueden formular en composiciones farmacéuticas según los siguientes ejemplos generales.

Ejemplo 1: Composición parenteral

Para preparar una composición farmacéutica parenteral adecuada para administración mediante inyección, se disuelven en DMSO 100 mg de una sal hidrosoluble de un compuesto de fórmula I y después se mezcla con 10 ml de solución salina estéril al 0,9%. Se incorpora la mezcla en una forma de dosificación unitaria adecuada para administración mediante inyección.

Ejemplo 2: Composición oral

Para preparar una composición farmacéutica para distribución oral mediante inyección, se mezclan 100 mg de un compuesto de fórmula I con 750 mg de lactosa Se incorpora la mezcla en una forma de dosificación unitaria oral, tal como una cápsula dura de gelatina, que es adecuada para administración oral.

Ejemplo 3: Composición intraocular

Para preparar una composición farmacéutica de liberación sostenida para distribución intraocular, se suspende un compuesto de fórmula I en una

solución isotónica, neutra de ácido hialurónico (1,5%· de conc.) en tampón fosfato (pH 7,4) para formar una suspensión al 1%.

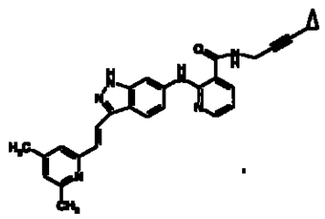
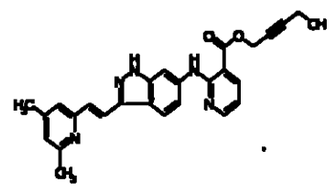
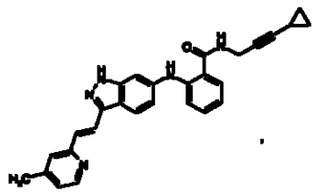
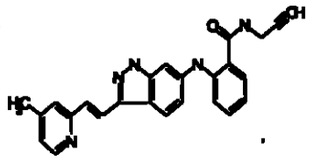
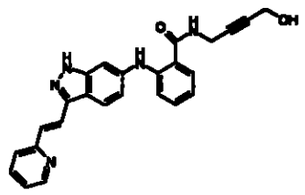
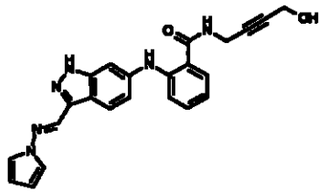
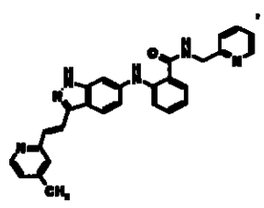
Se entiende que la descripción anterior es ejemplar y de naturaleza aclaratoria, y tiene la intención de ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas. A través de la experimentación habitual, el técnico reconocerá modificaciones y variaciones evidentes que se pueden realizar sin salirse del espíritu de la invención. De este modo, la invención tiene la intención de definirse no solamente por la memoria descriptiva anterior, sino mediante las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

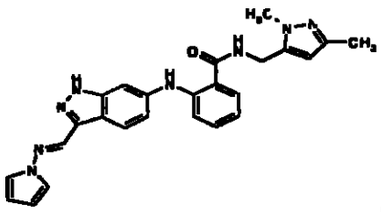
Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo descrito en las siguientes

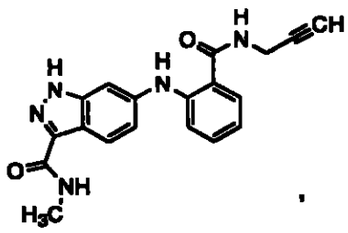
REIVINDICACIONES

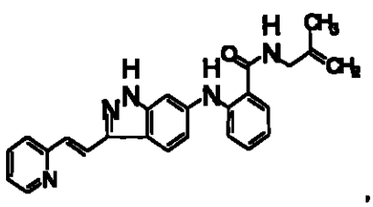
Lo que se reivindica es:

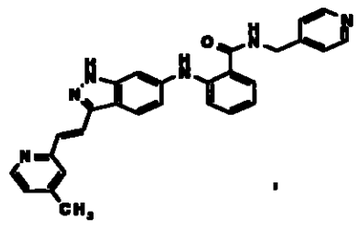
1. Un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable, seleccionado del grupo constituido por

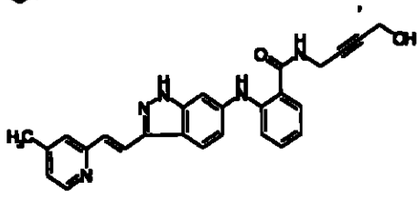








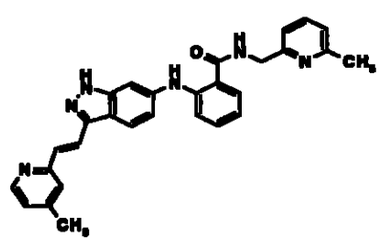


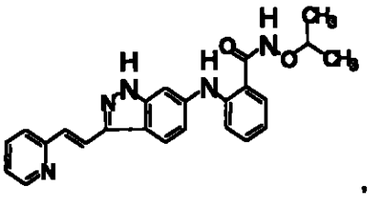


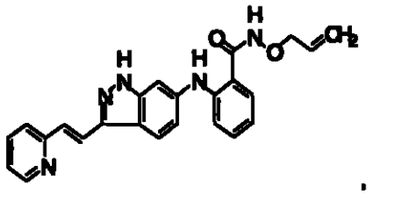


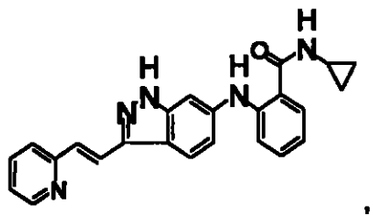


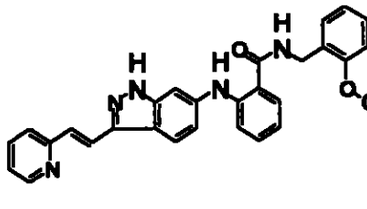


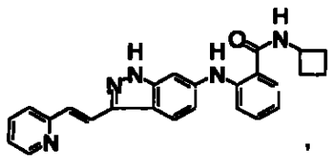


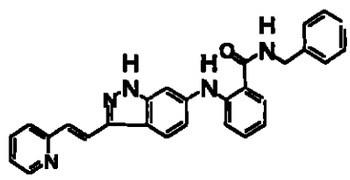


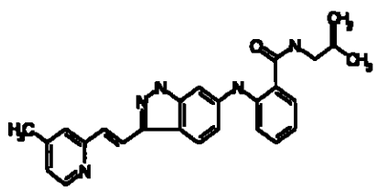


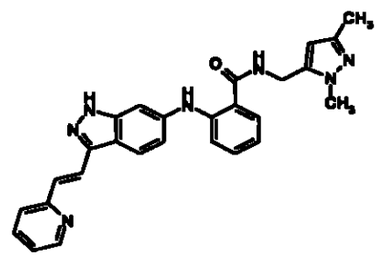


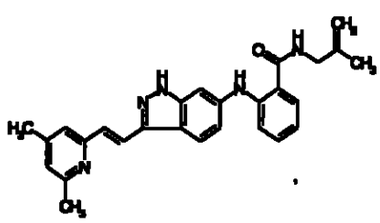


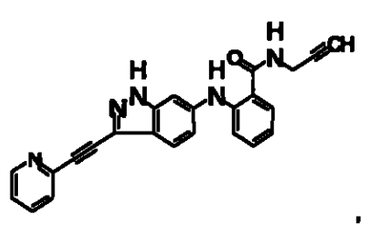


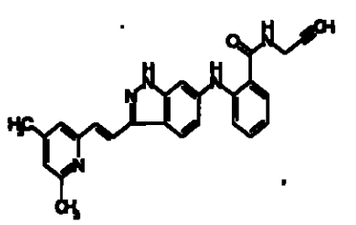


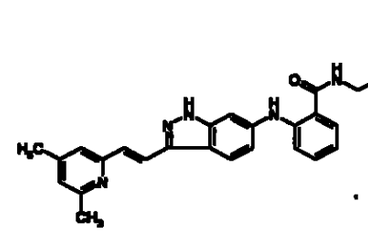


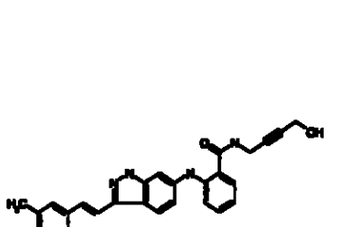


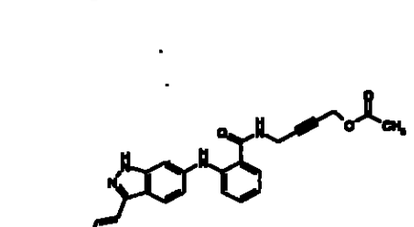


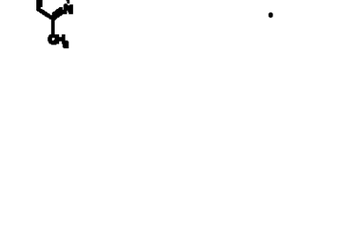


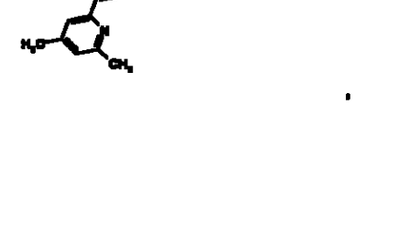


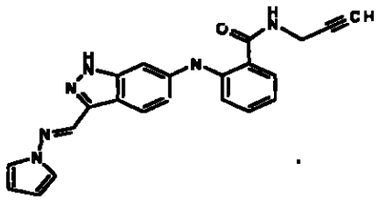


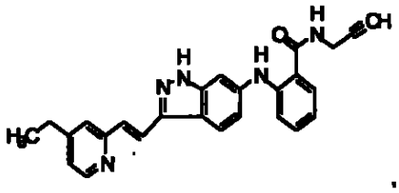


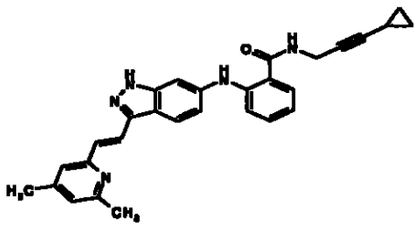


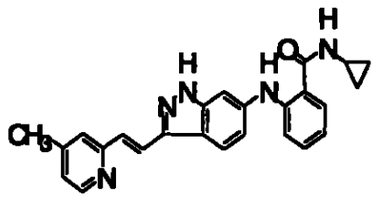


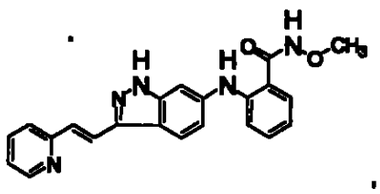


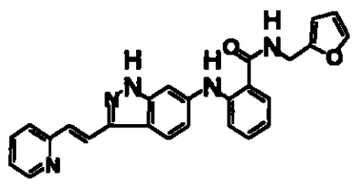


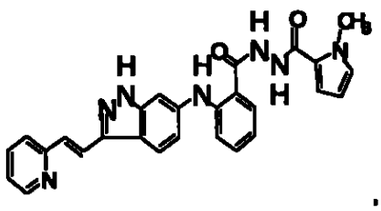


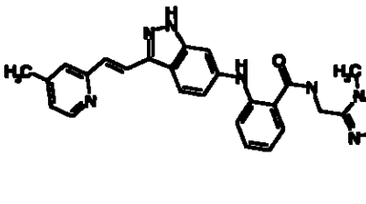


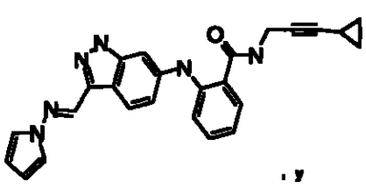




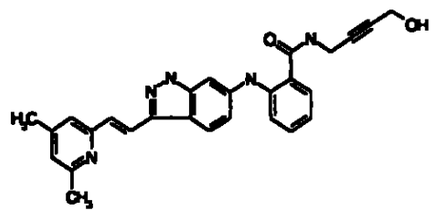








2. Un compuesto representado por la fórmula



, o un profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

3. Un procedimiento de uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 para tratar degeneración macular relativa a la edad en un mamífero.

4. Un procedimiento de uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 para tratar neovascularización coroidal en un mamífero.

5. Un procedimiento de uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 para tratar retinopatía en un mamífero.

6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que la retinopatía comprende retinopatía diabética, vitreorretinopatía, o retinopatía de prematurez.

7. Un procedimiento de uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 para tratar retinitis en un mamífero.

8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que la retinitis comprende retinitis por citomegalovirus.

9. Un procedimiento de uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 para tratar edema macular en un mamífero.

10. Un procedimiento de uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable como se ha

definido en la reivindicación 1 ó 2 para tratar una enfermedad oftálmica en un mamífero.

11. Una composición farmacéutica que comprende:

(a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable de las reivindicaciones 1 ó 2; y

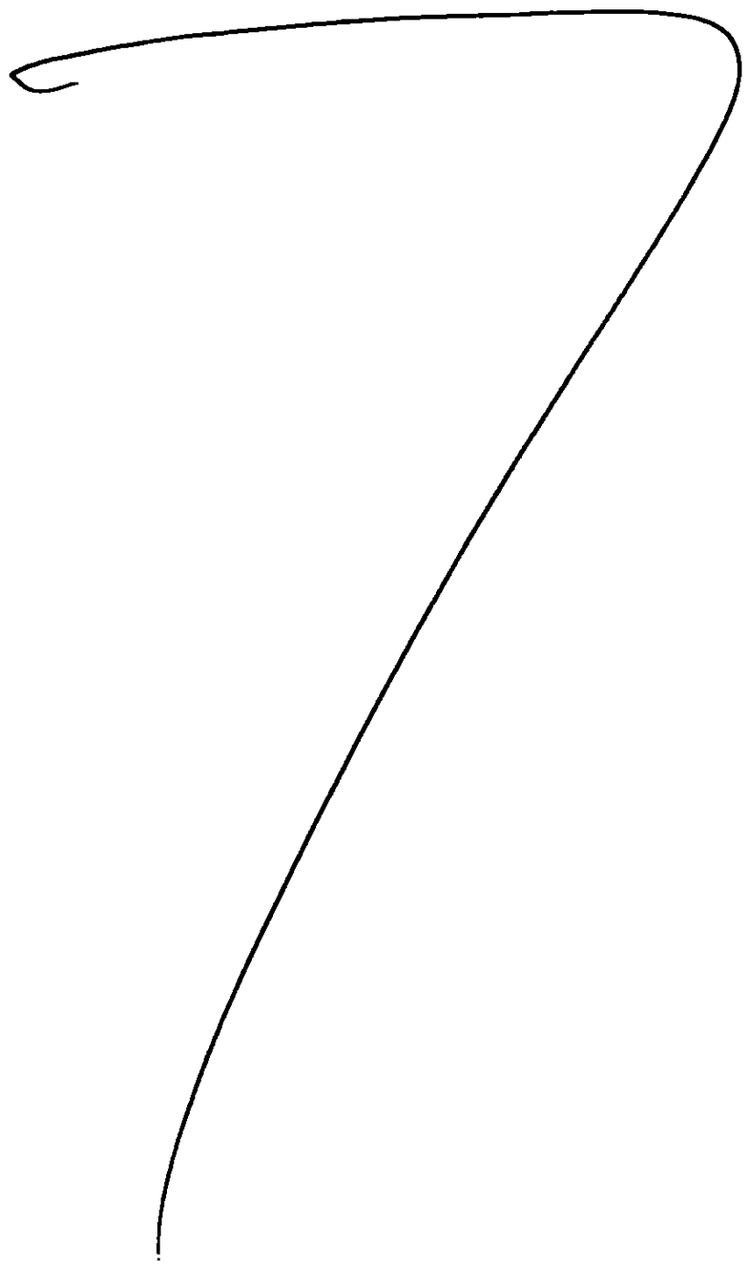
(b) un excipiente, diluyente o vehículo del mismo.

12. Un procedimiento de uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 para tratar una afección de una enfermedad de mamífero mediada por actividad proteinquinasa.

13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que la afección de enfermedad del mamífero se asocia con crecimiento tumoral, proliferación celular, o angiogénesis.

14. Un procedimiento de modulación de la actividad de un receptor de proteinquinasa, que comprende poner en contacto el receptor de quinasa con una cantidad eficaz de un compuesto, profármaco farmacéuticamente aceptable, metabolito farmacéuticamente activo, o sal farmacéuticamente aceptable como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2.

15. Un procedimiento según la reivindicación 14, en el que el receptor de proteinquinasa es un receptor VEGF.



RESUMEN

Se describen compuestos de indazol que modulan y/o inhiben las enfermedades oftálmicas y la actividad de ciertas proteinquinasas. Estos compuestos y composiciones farmacéuticas que los contienen son capaces de mediar la transducción de la señal de tirosina quinasa y por lo tanto modular y/o inhibir la proliferación celular no deseada. La invención también se refiere al uso terapéutico o profiláctico de las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos, y a procedimientos de tratamiento de enfermedades oftálmicas y cáncer y otros estados de enfermedad asociados con angiogénesis y/o proliferación celular no deseadas, tales como retinopatía diabética, glaucoma neovascular, artritis reumatoide y psoriasis, mediante la administración de cantidades eficaces de dichos compuestos.

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
LUMB, J. Trevor
c/o Jackie Lawrence
PFIZER INC
Eastern Point Road, MS 8260-1615
Groton, Connecticut 06340
Estados Unidos de América.

Sello de recibido 10 de marzo de 2005, PFIZER INC. Departamento de Patentes, Presentaciones extranjeras Groton.

Fecha de envío: 04.03.2005
Referencia del solicitante o representante: PC19172A
No. de Solicitud Internacional: PCT/IB03/05854
Fecha de presentación internacional: 08.12.2003
Fecha de prioridad: 19.12.2002
Solicitante: PFIZER INC. et. al.

1. Por la presente se notifica al solicitante que esta Autoridad de Revisión Preliminar Internacional transmite adjunto a la presente el reporte de examen preliminar internacional y sus anexos, si existen, existentes en la solicitud internacional.

2. Una copia del reporte y sus anexos, si los hay, serán transmitidos a la Oficina Internacional para dar comunicación a todas las Oficinas designadas.

3. Donde se requiera por cualquiera de las Oficinas designadas, la Oficina Internacional preparará una traducción al inglés del reporte (pero no de sus anexos) y transmitirá tal traducción a aquellas Oficinas.

4. RECORDATORIO

El solicitante deberá entrar en la fase nacional ante cada Oficina designada realizando ciertos actos (presentando traducciones y cancelando tarifas nacionales) dentro de 30 meses a partir de la fecha de prioridad (o después en algunas Oficinas) (Artículo 39 (1)) (ver también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional con el Formulario PCT/IB/301).

Donde se deba presentar una traducción de la solicitud internacional ante una Oficina designada, la traducción deberá contener una traducción de cualquier anexo del

reporte de examen preliminar internacional. Es responsabilidad del solicitante preparar y presentar tal traducción directamente a cada Oficina designada.

Para más información con respecto a los plazos y requisitos de las Oficinas designadas, ver el Volumen II de la Guía del Solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante al Artículo 33(5), el cual estipula que los criterios de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial descritos en el Artículo 33(2) a (4) sirven meramente para propósitos del examen preliminar internacional y que "cualquier estado miembro puede aplicar criterios adicionales o diferentes para los propósitos de decidir si, en ese estado, los inventos reivindicados son patentables o no" (ver también Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden estar relacionados, por ejemplo, con excepciones a partir de la patentabilidad, requerimientos para permitir la divulgación, claridad y soporte para las reivindicaciones.

Nombre y dirección de correspondencia de la Autoridad de Revisión Preliminar Internacional:
Oficina de Patentes Europea
D-80298 – Munich
Tel: +49-89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d
Fax: +49-89 2399 – 4465.

Funcionario Autorizado: Siefert, A
Tel: + 49 89 2399-2469

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del solicitante o representante: PC19172A
No. de Solicitud Internacional: PCT/IB03/05854
Fecha de presentación internacional: 08.12.2003
Fecha de prioridad: 19.12.2002
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o ambas, clasificación nacional e IPC: C07D401/14
Solicitante: PFIZER INC et. al.

1. El reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Revisión Preliminar Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 36.

2. Este REPORTE consta de 6 hojas, incluyendo esta cubre hoja.
__ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, hojas de la descripción, reivindicaciones, y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base para este reporte y/o hojas que contengan rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas bajo el PCT).

Estos anexos constan de _hojas.

3. Este reporte contiene indicaciones con relación a los siguientes ítems:
I. X Base para el reporte
II. ☐ Prioridad
III. X Ninguna opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial.
IV. ☐ Falta de unidad inventiva
V. X Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a) (ii) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citas y explicaciones soportando dicha declaración.
VI. ☐ Ciertos documentos citados
VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional
VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Fecha de radicación de la demanda: 28.01.2004
Fecha de elaboración de este reporte: 04.03.2005
Nombre y dirección de correspondencia de la Autoridad de Revisión Preliminar Internacional:
Oficina de Patentes Europea
D-80298 – Munich
Tel: +49-89 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: + 49-89 2399-4465
Funcionario Autorizado: Schuemacher, A.

Tel: +49 89 2399-7818

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

No. de Solicitud Internacional: PCT/IB03/05854

I. Base del reporte

1. Con respecto a los **elementos** de la solicitud internacional (Hojas de reemplazo, entregadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14, son referidas en este reporte como "presentadas originalmente" y no están anexadas al presente puesto que no contienen enmiendas (Reglas 70.16 y 70.17)):

Descripción, páginas:

1-95 tal como se presentó originalmente

Reivindicaciones, Nos.:

1-15 tal como se presentó originalmente

2. Con respecto al **idioma**, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual fue presentada la solicitud internacional, a menos que se indique de otra manera bajo este punto.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el siguiente idioma: , el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada con fines de la búsqueda internacional (bajo Regla 23.1(b)).
- ☐ el idioma de la publicación de la solicitud internacional (bajo Regla 48.3 (b)).
- ☐ el idioma de una traducción suministrada con fines del examen preliminar internacional (bajo Regla 55.2 y/o 55.3).

3. Con respecto a cualquier **secuencia nucleótida y/o de amino ácidos** divulgada en la solicitud internacional, el examen preliminar internacional fue realizado con base en el listado de secuencias:

- ☐ contenido en la solicitud internacional por escrito.
- ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma electrónica
- ☐ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad por escrito
- ☐ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad en forma electrónica
- ☐ Ha sido suministrada la declaración donde indica que el listado suministrado de secuencias escrito no va más allá de la divulgación encontrada en la solicitud internacional tal como se presentó

☐ Ha sido suministrada la declaración que indica que la información registrada en forma electrónica es idéntica al listado de secuencias escrito.

4. Las enmiendas han resultado en la cancelación de:

☐ la descripción, páginas:
☐ las reivindicaciones, Nos.:
☐ los dibujos, hojas:

5. Este reporte ha sido establecido como si no estuvieran hechas las enmiendas, puesto que se consideró que iban más allá de la divulgación tal como se presentó (Regla 70.2(c)).

(*Cualquier hoja de reemplazo que contenga tales enmiendas debe referirse al ítem 1 y estar adjunto a este reporte.)*

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

III. Ninguna formulación de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo, y aplicación industrial

1. Las preguntas con respecto a si el invento reivindicado parece ser novedoso, tener nivel inventivo (no ser obvio), o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas con respecto a:

☐ toda la solicitud internacional,
X reivindicaciones Nos. 3-10, 12-15

puesto que:

X dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 3-10, 12-15 se relacionan con el siguiente tema el cual no requiere examen preliminar internacional (especifique):

ver página adjunta

☐ la descripción, reivindicaciones, o dibujos (indique elementos en particular a continuación) o tales reivindicaciones Nos. están tan ambiguas que ninguna opinión significativa pudo formularse (especifique):

☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones No. están tan inapropiadamente soportadas que no se pudo formar una opinión significativa.

☐ no se ha establecido ninguna búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.

2. Un examen preliminar internacional significativo no puede efectuarse debido a que el listado de secuencias nucleótidas y/o de amino ácidos no cumple con el estándar suministrado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas:

☐ la forma escrita no ha sido suministrada o no cumple con el estándar

☐ la forma electrónica no ha sido suministrada o no cumple con el estándar

V. Declaración razonada según el Artículo 35(2) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial: anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones 1-15
	No:	Reivindicaciones
Nivel Inventivo (NI)	Si:	Reivindicaciones
	No:	Reivindicaciones 1-15
Aplicación Industrial (AI)	Si:	Reivindicaciones 1, 2, 11
	No:	Reivindicaciones

2. Anterioridades y explicaciones

Ver hoja adjunta

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL – HOJA ANEXA
Solicitud Internacional No. PCT/IB03/05854

Ítem III
No formulación de opinión con respecto a novedad, nivel inventivo, y aplicación industrial

Las reivindicaciones 3-10 y 12-15 se relacionan con materia considerada por esta Autoridad cubierta por las provisiones encontradas en la Regla 67.1 (iv) del PCT. Por lo tanto, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicación industrial de la materia de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT). Como ya se mencionó en el reporte de búsqueda internacional con fecha de 11.03.2004, una búsqueda significativa de la materia de estas reivindicaciones 1-15 es imposible. La búsqueda se limitó a los compuestos de las reivindicaciones 1 y 2 y su uso terapéutico (reivindicaciones 3-15). De hecho, el alcance de las reivindicaciones se refiere a los términos "profármacos" y "metabolitos activos". Estos términos son definiciones funcionales los cuales tratan de definir un compuesto químico en términos de un resulto a ser logrado. Esto no se permite (Artículo 6 del PCT). En la descripción en la página 20, la definición de estos términos se refiere a "compuestos que podrán ser convertidos bajo condiciones fisiológicas o por solvólisis ..." o "productos farmacológicamente activos producidos por el metabolismo en el cuerpo ...". Estas definiciones podrían verse como una mera invitación a una persona versada en el arte para que llevar a cabo una investigación con el fin de encontrar los variantes adecuados. En tal situación, cuando el invento no puede llevarse a cabo sobre la totalidad del capítulo reivindicado sin imponer un problema innecesario, la divulgación podrá considerarse insuficiente a la luz del artículo 5 del PCT. Puesto que no se ha realizado una búsqueda completa, cualquier declaración hecha en este comunicado con respecto a novedad y nivel inventivo son hechas por lo tanto a la luz de aquellas reivindicaciones buscadas de manera completa, es decir las reivindicaciones 1 y 2 con la excepción de cualquier profármaco y metabolito activo de las mismas.
Por consiguiente, la presente solicitud debe ser restringida de esa manera.

Ítem V
Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, nivel inventivo, y aplicación industrial; citas y explicaciones soportando cada declaración.

1. Novedad, Artículo 33(2) del PCT:

Se hace referencia a los siguientes documentos:
D1: WO 01 002369 A (AGOURON PHARMACEUTICALS, INC., USA) (2001-01-11)
D2: WO 01 53268 A (AGOURON PHARMA) (2001-07-26)
D3: WO-A-9218489

Con respecto al estado de la técnica divulgado en los documentos citados anteriormente, la materia de la presente solicitud, es decir, los compuestos de 2-(1H-indazol-6-

ilamino)benzamida, parece cumplir con los requisitos de novedad, el Artículo 33(3) del PCT:
Los compuestos de D2 difieren de los compuestos reivindicados puesto que les falta el sustituyente 2-amino-benzamida sobre la posición 6 del anillo indazol.
La materia de la reivindicación 1 está totalmente incluida en la divulgación genérica de los compuestos de D1 (ver las reivindicaciones 1 y 10 de D1). Puesto que este documento no contiene ejemplos específicos de compuestos que caen dentro del alcance de la reivindicación 1, la materia de la presente solicitud podría considerarse como una selección novedosa de los compuestos de D1 y la selección consiste en escoger un grupo amino como enlace entre el anillo indazol y el benzamida y específicamente sobre la posición 2 del anillo de benzamida.
Por consiguiente, se considera que se cumplen los requisitos establecidos en el Artículo 33(3) del PCT.

2. Nivel Inventivo, Artículo 33(3) del PCT:

Parece ser que el solicitante se ha puesto en la tarea de hacer disponibles más inhibidores de enfermedades oftálmicas los cuales también son útiles para el tratamiento del cáncer y enfermedades asociadas con angiogénesis no deseadas y/o proliferación celular, ver el segundo párrafo de la página 1.

El documento D1, el cual se refiere a inhibidores de proteinquinasas (ver reivindicaciones 15-17 en D1), se considera el documento más cercano en el estado de la técnica. Puesto que la presente solicitud es considerada como una selección novedosa de D1, el problema del presente invento tiene que verse en el suministro de inhibidores de proteinquinasas los cuales poseen efectos ventajosos inesperados al compararse con los ya conocidos inhibidores de proteinquinasas de D1.
La presente solicitud contiene (p. 84-95) datos farmacológicos que muestra que los compuestos reivindicados en efecto son capaces de inhibir la actividad de receptores de VEGF-R2, FGF-R1, LCK, CHK1, CDK, FAK, y TEK. Sin embargo, estas actividades inhibitorias de los compuestos reivindicados no son inesperados a la luz de D1.
No existe evidencia alguna en la presente solicitud que demuestra que los compuestos reivindicados poseen un efecto mejorado inesperado en comparación con los compuestos de D1.
No se puede reconocer un nivel inventivo puesto que aún no se demuestra mediante información adecuada que la materia reivindicada proporciona un efecto sorprendente o inesperado con respecto a los compuestos de D1.
Se considera que no se cumplen los requisitos establecidos en el Artículo 33(3) del PCT.

3. Aplicación Industrial:

Para la evaluación de las reivindicaciones 3-10 Y 12-15 de la presente, sobre si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados en los Estados pertenecientes al PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable aquella materia que reivindique el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero permite, sin embargo, reivindicar sobre un compuesto conocido para primero uso en

tratamiento médico y el uso de tal compuesto en la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

PATENT COOPERATION TREA

82
238
239

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

LUMB, J., Trevor
Pfizer Inc.
c/o Jackie Lawrence
Eastern Point Road MS8260-1615
Groton, CT 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
MAR 10 2005
PFIZER INC - PATENT DEPT.
FOREIGN FILING - GROTON

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

	Date of mailing *(day/month/year)* 04.03.2005
Applicant's or agent's file reference PC19172A	**IMPORTANT NOTIFICATION**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/IB 03/05854	08.12.2003	19.12.2002

Applicant
PFIZER INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. **REMINDER**

   The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

   Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

   For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

   The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Siefert, A Tel. +49 89 2399-2469

Form PCT/IPEA/416 (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC19172A	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/IB 03/05854	International filing date *(day/month/year)* 08.12.2003	Priority date *(day/month/year)* 19.12.2002
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C07D401/14		
Applicant PFIZER INC. et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

   ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

   These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

   - I ☒ Basis of the opinion
   - II ☐ Priority
   - III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
   - IV ☐ Lack of unity of invention
   - V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
   - VI ☐ Certain documents cited
   - VII ☐ Certain defects in the international application
   - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
28.01.2004	04.03.2005
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Schuemacher, A Telephone No. +49 89 2399-7818

240
241

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/IB 03/05854

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17))*:

Description, Pages

1-95 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination 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.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT International application No. PCT/IB 03/05854

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

   ☐ *the entire international application,*

   ☒ **claims Nos. 3-10, 12-15**

   because:

   ☒ **the said international application, or the said claims Nos. 3-10, 12-15 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):**

   see separate sheet

   ☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

   ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

   ☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

   ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the Standard.

   ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the Standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-15
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-15
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1,2,11
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 3-10 and 12-15 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).
As already indicated in the international search report dated 11.03.2004, a meaningful search covering the subject-matter of present claims 1-15 is impossible. The search was limited to compounds of claims 1 and 2 and their therapeutic use (claims 3-15). In fact, the scope of the claims refers to the terms "prodrugs" and "active metabolites". These terms are functional definitions which attempt to define a chemical compound in terms of a result to be achieved. This is not allowable (Article 6 PCT). In the description on p.20 the definition of these terms refers to "compounds that may be converted under physiological conditions or by solvolysis..." or "pharmacologically active products produced through metabolism in the body...". These definitions could be seen as a mere invitation to the skilled person to perform a research program in order to find the suitable variants. In such a situation, when the invention cannot be carried out over the whole claimed area without imposing an undue burden, the disclosure may be considered insufficient in the sense of Article 5 PCT. Since a complete search has not been carried out, any statements made in this communication with respect to novelty and inventive step are thus made in the light of those claims which were searched completely, namely compounds of claims 1 and 2 with the exception of any prodrugs and active metabolites thereof.
The present application should be restricted accordingly.

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step r industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Novelty, Article 33(2) PCT:

Reference is made to the following documents:

D1: WO 01 002369 A (AGOURON PHARMACEUTICALS, INC., USA)(2001-01-11)
D2: WO 01 53268 A (AGOURON PHARMA) (2001-07-26)

With regard to the prior art disclosed in the documents cited above the subject-matter of the present application, i.e 2-(1H-indazol-6-ylamino)benzamide compounds, appears to fulfil the requirements of novelty, cf. Article 33(2) PCT:
The compounds of D2 differ from the claimed compounds because they miss th 2-amino-benzamide substituent on the 6-position of the indazole ring.
The subject-matter of claim 1 is totally included in the generic disclosure of the compounds of D1 (see claims 1 and 10 of D1). Since this document does not contain specific examples of compounds falling within the scope of present claim 1, the subject-matter of the current application could be considered as a novel selection of the compounds of D1 and the selection consists in choosing a an amino as link between the indazole and the benzamide ring and specifically in position 2 of the benzamide ring.
Thus, the requirements of Article 33(2) PCT are considered to be met.

2. inventive step, Article 33(3) PCT:

The Applicant appears to have set himself the task of making available further inhibitors of ophthalmic diseases which are also useful in the treatment of cancer and diseases associated with unwanted angiogenesis and/or cell proliferation see, second paragraph on page 1.

Documents D1, directed to protein kinases inhibitors (see claims 15-17 in D1), is considered as the closest prior art document. As the current application is considered as a novel selection of D1, the problem underlying the present invention has to be seen in the provision of protein kinases inhibitors which have unexpected advantageous effects when compared to the already known protein kinases inhibitors of D1.
The present application contains p.84-95 pharmacological data showing that the claimed compounds indeed are able to inhibit the activity of VEGF-R2, FGF-R1, LCK, CHK1, CDK, FAK and TEK receptors. However, these inhibitory activities of the claimed compounds are not unexpected in the view of D1.
There is no evidence in the present application proving that the claimed compounds possess an unexpected improved effect compared to the compounds of D1.
An inventive step cannot be recognized as it is not yet shown by appropriate information that the claimed subject-matter provides an unexpected or surprising effect with regard to the compounds of D1.
The requirements of Article 33(3) PCT are not considered to be satisfied.

3. Industrial applicability:

For the assessment of the present claims 3-10 and 12-15 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

INTERNATIO SEARCH REPORT

Int[redacted] Application No
PCT/IB 03/05854

245
246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D401/14 C07D401/06 C07D403/12 C07D403/14 C07D231/56
C07D405/14 A61K31/416 A61P35/00 A61P27/02

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)
IPC 7 C07D A61K

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 practical, search terms used)
CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01 002369 A (AGOURON PHARMACEUTICALS, INC., USA) 11 January 2001 (2001-01-11) examples 39(a) and 39(b) page 16, line 5 - line 20; claims 10-12,15,17	1-15
Y	WO 01 53268 A (AGOURON PHARMA) 26 July 2001 (2001-07-26) claims 3,8,10,22-24	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but 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 citation 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 March 2004	19/03/2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Schuemacher, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal application No.
CT/IB 03/05854

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 3-10 and 12-15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims 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:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims 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:

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.

International Application No. PCT/IB 03 05854

Continuation of Box I.2

The present claims 1-15 relate inter alia to "prodrugs" and "active metabolite", i.e compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, whereas the application appears to provide no support within the meaning of article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for the said prodrugs and metabolites. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds defined by their formula in claim 1 with the exception of any prodrugs or active metabolites thereof.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/EP 03/05854

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 01002369 A	11-01-2001	AU 5785200 A	22-01-2001
		BG 106380 A	30-09-2002
		BR 0012352 A	14-05-2002
		CA 2383630 A1	11-01-2001
		CN 1137884 C	11-02-2004
		CZ 20014634 A3	11-09-2002
		EE 200100717 A	17-02-2003
		EP 1218348 A2	03-07-2002
		HR 20020109 A2	31-12-2003
		HU 0202490 A2	28-11-2002
		JP 2003503481 T	28-01-2003
		NO 20015797 A	01-03-2002
		NZ 516676 A	26-09-2003
		SK 19252001 A3	06-11-2002
		WO 0102369 A2	11-01-2001
		US 6534524 B1	18-03-2003
		US 6531491 B1	11-03-2003
		ZA 200110061 A	06-02-2003
WO 0153268 A	26-07-2001	AU 2953901 A	31-07-2001
		BG 107011 A	30-04-2003
		BR 0107783 A	19-11-2002
		CA 2388885 A1	26-07-2001
		CN 1394205 T	29-01-2003
		EE 200200398 A	15-10-2003
		EP 1250326 A2	23-10-2002
		HU 0203965 A2	28-05-2003
		JP 2003520273 T	02-07-2003
		NO 20022117 A	16-09-2002
		SK 10052002 A3	04-03-2003
		WO 0153268 A2	26-07-2001
		US 2003139463 A1	24-07-2003
		US 2002161022 A1	31-10-2002
		ZA 200203040 A	11-08-2003

247
248

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN ✓ 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 o 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:

Fecha: Julio 17 de 2005

249

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 248

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
CARLOS R. OLARTE
Apoderado(a) y/o Representante
PFIZER INC

REFERENCIA:	Radicación No.	05 59483
	Solicitud Internacional	PCT/IB2003/005854
	Fecha límite inicio fase Nacional	19 – 07 - 2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	795
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC 19 SET. 2005

ALIX CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Conmutador: 3 820840 Fax. 3 505220
Sede CAN: Tr. 40 A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia