



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0117360-0 B1



(22) Data do Depósito: 15/02/2001

(45) Data de Concessão: 13/11/2018

(54) Título: INIBIDORES DE PROTEÍNA DE QUINASE DE 2-INDOLINONA DE PIRROL SUBSTITUÍDO, SEUS SAIS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07D 403/00; A61K 31/403; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 06/07/2000 US 60/216,422; 15/02/2000 US 60/182,710; 27/10/2000 US 60/243,532.

(73) Titular(es): PHARMACIA & UPJOHN COMPANY; SUGEN, INC..

(72) Inventor(es): TODD A. MILLER; PENG CHO TANG; XIAOYUAN LI; LI SUN; CHUNG CHEN WEI; SHAHRZAD SHIRAZIAN; CONGXIN LIANG; TOMAS VOJKOVSKY; ASAAD S. NEMATALLA; MICHAEL HAWLEY.

(86) Pedido PCT: PCT US2001004813 de 15/02/2001

(87) Publicação PCT: WO 2001/060814 de 23/08/2001

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/06/2011

(62) Pedido Original do Dividido: PI0108394-5 - 15/02/2001

(57) Resumo: INIBIDORES DE PROTEÍNA DE QUINASE DE 2-INDOLINONA DE PIRROL SUBSTITUÍDO, SEUS SAIS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS MESMOS. A presente invenção refere-se a compostos de 2-indolinona de pirrol substituído e seus sais farmaceuticamente aceitáveis que regulam a atividade de cinases de proteínas e, portanto, se espera sejam úteis na prevenção e tratamento de doenças celulares relacionadas com cinase de proteína tais como câncer.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"INIBIDORES DE PROTEÍNA DE QUINASE DE 2-INDOLINONA DE
PIRROL SUBSTITUÍDO, SEUS SAIS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS
COMPREENDENDO OS MESMOS".**

5 Dividido do PI 0108394-5, depositado em
15.02.2001.

INFORMAÇÕES CORRELATAS

Este pedido de patente reivindica prioridade, de
acordo com 35 U.S.C. 119 (e), para os Pedidos de Patente
10 Provisórios Nos. de Série 60/182.710 depositado em 15 de
fevereiro de 2000, 60/216.422 depositado em 06 de julho
de 2000 e 60/243.532 depositado em 27 de outubro de 2000,
cuja descrição são aqui incorporadas nas suas totalida-
des mediante referência.

15 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a alguns compostos
de 2-indolinona de 3-pirrol substituído que modulam a a-
tividade de cinases de proteínas ("PKs"). Os compostos
20 desta invenção são, portanto, úteis no tratamento de do-
enças relacionadas com atividade anormal de PKs. Composi-
ções farmacêuticas que compreendem estes compostos, méto-
dos de tratamento de doenças utilizando composições far-
macêuticas que compreendem estes compostos e métodos de
25 preparação das mesmas são também descritos aqui.

Estado da Técnica

O que se segue é oferecido apenas como informa-
ção sobre fundamentos e não é admitido como sendo técnica
anterior da presente invenção.

30 PKs são enzimas que catalisam a fosforilação de
grupos de hidroxil sobre resíduos de proteínas de tirosina,
serina e treonina. As consequências desta atividade aparen-
temente simples são surpreendentes: crescimento, diferencia-
ção e proliferação da célula, isto é, virtualmente todos os

aspectos da vida da célula de um modo ou de outro dependem da atividade das PKs. Além disso, atividade anormal de PK foi relacionada a inúmeras doenças, variando de doenças relativamente não-ameaçadoras da vida, tal como psoríase, até doenças extremamente virulentas, tal como glioblastoma (câncer cerebral).

As PKs podem ser convenientemente divididas em duas categorias, proteínas de tirosinas quinases (PTKs) e as serinas-treoninas quinases (STKs).

Um dos principais aspectos da atividade de PTKs é o seu envolvimento com receptores de fatores de crescimento. Receptores de fatores de crescimento são proteínas da superfície da célula. Quando aglutinados por um ligante de fator de crescimento, os receptores de fatores de crescimento são convertidos em uma forma ativa que interage com proteínas sobre a superfície interna de uma membrana da célula. Isto conduz à fosforilação sobre resíduos de tirosina do receptor e de outras proteínas e à formação dentro da célula de complexos com uma variedade de moléculas citoplásticas de sinalização que, por sua vez, realizam diversas respostas celulares tais como divisão de célula (proliferação), diferenciação de célula, crescimento de célula, expressão de efeitos metabólicos para o micro-ambiente celular, etc. Para uma discussão mais completa, vide Schlessinger e Ullrich, Neuron, 9:303-391 (1992) que está incorporado mediante referência, incluindo quaisquer desenhos, como se totalmente mencionado aqui.

Receptores de fatores de crescimento com atividade de PTK são conhecidas como receptor de tirosinas quinases ("RTKs"). As mesmas compreendem uma grande família de

receptores de transmembrana com atividade biológica diversa. No momento, pelo menos dezenove (19) subfamílias distintas de RTKs foram identificadas. Um exemplo destas é a subfamília designada RTKs "HER", que inclui EGFR (receptor de fator de crescimento epitelial), HER2, HER3 e HER4. Estas RTKs consistem em um domínio aglutinante de ligante glicosilado extracelular, um domínio de transmembrana e um domínio catalítico citoplásmico intracelular que pode fosforilar resíduos de tirosina sobre proteínas.

Outra subfamília de RTK consiste em receptor de insulina (IR), receptor de fator de crescimento I tipo insulina (IGF-1R) e receptor relacionado com receptor de insulina (IRR). IR e IGF-1R interagem com insulina, IGF-I e IGF-II para formar uma heterotetrâmera de duas subunidades α glicosiladas inteiramente extracelulares e duas subunidades β que cruzam a membrana da célula e que contêm o domínio de tirosina quinase.

Uma terceira subfamília de RTK é denominada grupo receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta ("PDGFR"), o qual inclui PDGFR α , PDGFR β , CSF1R, c-kit e c-fms. Estes receptores consistem em domínios extracelulares glicosilados compostos de números variáveis de laços tipo imunoglobina e um domínio intracelular onde o domínio de tirosina quinase é interrompido por seqüências de aminoácidos não-correlatos.

Outro grupo que, devido à sua similaridade com a subfamília PDGFR, é algumas vezes incluída no último grupo é a subfamília de receptor de quinase de fígado de feto ("flk"). Acredita-se que este grupo seja constituído por

quinase-1 de fígado fetal de receptor de domínio de inserção de quinase (KDR/FLK-1, VEGF-R2), flk-1R, flk-4 e tirosina quinase 1 tipo fms (flt-1).

Um elemento adicional da família de receptores de
5 fator de crescimento de tirosina quinase é o subgrupo receptor de fator de crescimento de fibroblasto ("FGF"). Este grupo consiste em quatro receptores, FGFR1-4, e sete ligantes, FGF1-7. Embora ainda não bem definidos, parece que os receptores consistem em um domínio extracelular
10 glicosilado que contém um número variável de laços tipo imunoglobina e um domínio intracelular no qual a sequência de tirosina quinase é interrompida por regiões de sequências de aminoácidos não-correlatos.

Ainda outro elemento da família receptora de fator de
15 crescimento de tirosina quinase é o subgrupo receptor de fator de crescimento vascular endotelial ("VEGF"). VEGF é uma glicoproteína dimérica similar a PDGF mas tem diferentes funções biológicas e especificidade de célula alvo *in vivo*. Em especial, pensa-se atualmente que VEGF tem
20 um papel essencial em vasculogênese e angiogênese.

Uma lista mais detalhada das subfamílias RTK conhecidas está descrita em Plowman e outros, DN&P, 7(6): 334-339 (1994) que está incorporado mediante referência, incluindo quaisquer desenhos, como se completamente
25 mencionado aqui.

Além das RTKs, existe também uma família de PTKs totalmente intracelulares denominadas "não-receptor de tirosinas quinases" ou "tirosinas quinases celulares". Esta última designação, abreviada "CTK", será usada aqui. CTKs
30 não contêm domínios extracelulares e de transmembrana. No

momento, mais de 24 CTKs em 11 subfamílias (Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes, Fps, Fak, Jak e Ack) foram identificadas. A subfamília Src parece ser de longe o maior grupo de CTKs e inclui Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr e Yrk. Para uma discussão mais detalhada de CTKs, vide Bolen, Oncogene, 8: 2025-2031 (1993), que está incorporado mediante referência, incluindo quaisquer desenhos, como se totalmente mencionado aqui.

As serinas/treoninas quinases, STKs, do mesmo modo que as CTKs, são predominantemente intracelulares, embora existam poucos receptores quinases do tipo STK. As STKs são as mais comuns das citosólicas quinases; isto é, quinases que realizam as suas funções naquela parte do citoplasma que não a organelas citoplásmica e citoesqueleto. O citosol é a região dentro da célula onde ocorre a maior parte da atividade biossintética e metabólica intermediária da célula; por exemplo, é no citosol que as proteínas são sintetizadas em ribossomas.

RTKs, CTKs e STKs têm sido todas implicadas em inúmeras condições patogênicas incluindo, significativamente, câncer. Outras condições patogênicas que têm sido associadas a PTKs incluem, sem limitação, psoríase, cirrose hepática, diabetes, angiogênese, restenose, doenças oculares, artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias, doenças imunológicas tais como doenças auto-imunes, doenças cardiovasculares tal como aterosclerose e uma variedade de doenças renais.

Em relação ao câncer, duas das maiores hipóteses avançaram para explicar como a proliferação celular excessiva que aciona o desenvolvimento do tumor se

relaciona com funções que se sabe são reguladas por PK. Isto é, foi sugerido que o crescimento de células malignas resulta de uma quebra no mecanismo que controla a divisão e/ou diferenciação da célula. Foi mostrado que os produtos
5 de proteína de diversos proto-oncogenes estão envolvidos nos percursos de transdução de sinal que regulam o crescimento e diferenciação da célula. Estes produtos de proteína de proto-oncogenes incluem os fatores de crescimento extracelulares, receptores PTK de fator de
10 crescimento de transmembrana (RTKs), PTKs citoplásmicos (CTKs) e STKs citosólicos, discutidos acima.

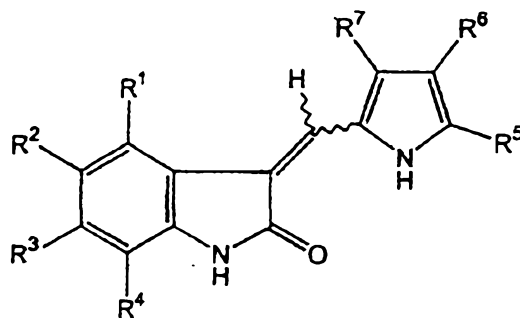
Devido à aparente ligação entre atividades celulares relacionadas com PK e a ampla variedade de doenças humanas, não é surpresa que um grande esforço esteja sendo consumido
15 em uma tentativa para identificar meios para modular atividade de PK. Parte deste esforço tem estado relacionado com técnicas biomiméticas que utilizam grandes moléculas padronizadas naqueles envolvidos nos processos celulares atuais (por exemplo, ligantes de mutação (Pedido de Patente
20 U.S. No. 4.966.849); receptores solúveis e anticorpos (Pedido de Patente No. WO 94/10202, Kendall e Thomas, Proc. Nat'l Acad. Sci., 90:10705-09 (1994), Kim, e outros, Nature, 362:841-844 (1993)); ligantes RNA (Jelinek, e outros, Biochemistry, 33:10450-56); Takano, e outros, Mol.
25 Bio. Cell 4:358A (1993); Kinsella, e outros, Exp. Cell Res. 199:56-62 (1992); Wright, e outros, J. Cellular Phys., 152:448-57) e inibidores de tirosina quinase (WO 94/03427; WO 92/21660; WO 91/15495; WO 94/14808; Patente U.S. No. 5.330.992; Mariani, e outros, Proc. Am. Assoc. Cancer Res.,
30 35:2268 (1994)).

Além do mencionado acima, foram feitas tentativas para identificar pequenas moléculas que agissem como inibidoras de PK. Por exemplo, compostos de arila bis- monocíclica, bicíclica e heterocíclica (PCT WO 92/20642), derivados de 5 vinilenoazaindola (PCT WO 94/14808) e 1-ciclopropil-4-piridilquinolonas Patente U.S. No. 5.330992) foram descritos como inibidores de tirosina quinase. Compostos de 10 estirila (Patente U.S. No. 5.217.999), compostos de piridila de estirila substituída (Patente U.S. No. 5.302.606), derivados de quinazolina (Pedido de Patente EP No. 0 566 266 A1), selenaindolas e selenidas (PCT WO 94/03427), compostos poliidroxicólicos tricíclicos (PCT WO 92/21660) e compostos de ácido benzilfosfônico (PCT WO 91/15495) foram todos descritos como inibidores de PTK 15 úteis no tratamento de câncer.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a alguns compostos de 2-indolinona de 3-pirrol substituído que apresentam capacidade de modulação de proteínas de quinases e que são, 20 portanto, úteis no tratamento de doenças relacionadas com atividade anormal de proteínas de quinases.

Conseqüentemente, em um aspecto, a presente invenção refere-se a 2-indolinona de 3-pirrol substituído de Fórmula (I):



(I).

onde:

R^1 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halo, alquila, cicloalquila, arila, heteroarila, heteroalíclico, hidroxí, alcoxi, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_rR^{16}$ e $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halo, alquila, trialometila, hidroxí, alcoxi, ciano, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, arila, heteroarila, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ e $-SO_2R^{20}$ (onde R^{20} é alquila, arila, aralquila, heteroarila e heteroaralquila);

R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, trialometila, hidroxí, alcoxi, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, arila, heteroarila, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-NR^{13}C(O)OR^{14}$ e $-SO_2R^{20}$ (onde R^{20} é alquila, arila, aralquila, heteroarila e heteroaralquila);

R^4 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, hidroxí, alcoxi e $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila e $-C(O)R^{10}$;

R^6 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila e $-C(O)R^{10}$;

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, arila, heteroarila, $-C(O)R^{17}$ e $-C(O)R^{10}$; ou

R^6 e R^7 podem combinar-se para formar um grupo selecionado a partir do grupo que consiste em $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ e $-(CH_2)_6-$;

com a condição de que pelo menos um dentre R^5 , R^6 ou R^7 deve ser $-C(O)R^{10}$;

R^8 e R^9 são independentemente selecionados a partir do

grupo que consiste em hidrogênio, alquila e arila;

R^{10} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, alcoxi, ariloxi, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ e $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} é selecionado a partir do grupo que consiste em
5 hidrogênio e alquila;

R^{12} é selecionado a partir do grupo que consiste em $-NR^{13}R^{14}$, hidroxí, $-C(O)R^{15}$, arila, heteroarila, $-N^+(O^-)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$ e $-NHC(O)R^a$ (onde R^a é alquila, haloalquila ou aralquila não-substituída);

10 R^{13} e R^{14} são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, alquila inferior substituída por hidroxialquilamino, cianoalquila, cicloalquila, arila e heteroarila; ou

R^{13} e R^{14} podem combinar-se para formar um grupo
15 heterocíclico;

R^{15} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, hidroxí, alcoxi e ariloxi;

R^{16} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ e $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

20 R^{17} é selecionado a partir do grupo que consiste em alquila, cicloalquila, arila e heteroarila;

R^{20} é alquila, arila, aralquila ou heteroarila; e

n e r são independentemente 1, 2, 3 ou 4;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

25 De preferência, R^1 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halo, alquila, cicloalquila, arila, heteroarila, heteroalícíclico, hidroxí, alcoxi, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_rR^{16}$ e $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 é selecionado a partir do grupo que consiste em
30 hidrogênio, halo, alquila, triálometila, hidroxí, alcoxi,

$-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, $-\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})\text{R}^{14}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, arila, heteroarila e $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$;

R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, trialometila, hidroxí, alcoxí, $-(\text{CO})\text{R}^{15}$, $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, arila, heteroarila, $-\text{NR}^{13}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{14}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, $-\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})\text{R}^{14}$ e $-\text{NR}^{13}\text{C}(\text{O})\text{OR}^{14}$;

R^4 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, hidroxí, alcoxí e $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$;

R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila e $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$;

R^6 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila e $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$;

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, arila, heteroarila, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ e $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$;

R^6 e R^7 podem combinar-se para formar um grupo selecionado a partir do grupo que consiste em $-(\text{CH}_2)_4-$, $-(\text{CH}_2)_5-$ e $-(\text{CH}_2)_6-$;

com a condição de que pelo menos um dentre R^5 , R^6 ou R^7 deve ser $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$;

R^8 e R^9 são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila e arila;

R^{10} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, alcoxí, ariloxí, $-\text{N}(\text{R}^{11})(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ e $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$;

R^{11} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila;

R^{12} é selecionado a partir do grupo que consiste em $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, hidroxí, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, arila e heteroarila;

R^{13} e R^{14} são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, cicloalquila,

arila e heteroarila;

R^{13} e R^{14} podem combinar-se para formar um grupo selecionado a partir do grupo que consiste em $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ e $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$;

5 R^{15} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, hidroxí, alcoxi e ariloxi;

R^{16} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ e $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} é selecionado a partir do grupo que consiste em
10 alquila, cicloalquila, arila e heteroarila; e

n e r são independentemente 1, 2, 3 ou 4;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

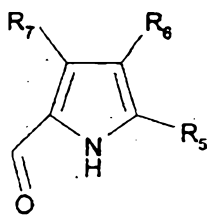
Em um segundo aspecto, esta invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende um ou mais
15 composto(s) de Fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Em um terceiro aspecto, esta invenção refere-se a um método de tratamento de doenças mediadas por atividade anormal de proteínas de quinases, em especial, receptor de
20 tirosinas quinases (RTKs), não-receptor de proteínas tirosinas quinases (CTKs) e proteínas de serinas/trioninas quinases (STKs), em um organismo, especialmente seres humanos, método este que compreende a administração ao referido organismo de uma composição farmacêutica que
25 compreenda um composto de Fórmula (I). Tais doenças incluem, a título de exemplo e não de limitação, câncer, diabetes, cirrose hepática, doenças cardiovasculares tais como aterosclerose, angiogênese, doenças imunológicas tais como doenças auto-imunes e doenças renais.

Em um quarto aspecto, esta invenção refere-se a um método de modulação da atividade catalítica de PKs, em especial, receptor de tirosinas quinases (RTKs), não-receptor de proteínas de tirosinas quinases (CTKs) e 5 proteínas de serinas/trioninas quinases (STKs), utilizando um composto desta invenção que pode ser transportado *in vitro* ou *in vivo*. Em particular, o receptor de proteína quinase cuja atividade catalítica é modulada por um composto desta invenção é selecionada a partir do grupo que 10 consiste em EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSF1R, C-kit, C-fms, Flk-1R, Flk4, KDR/Flk-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R, FGFR-3R e FGFR-4R. A tirosina quinase celular cuja atividade catalítica é modulada por um composto desta invenção é selecionada a partir do grupo que 15 consiste em Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr e Yrk. A proteína de serina-treonina quinase cuja atividade catalítica é modulada por um composto desta invenção é selecionada a partir do grupo que consiste em CDK2 e Raf.

20 Em um quinto aspecto, esta invenção refere-se ao uso de um composto de Fórmula (I) na preparação de um medicamento que é útil no tratamento de uma doença mediada por atividade anormal de PK.

Em um sexto aspecto, esta invenção refere-se a um 25 intermediário de Fórmula (II):



(II)

onde:

R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila e $-C(O)R^{10}$;

R^6 é selecionado a partir do grupo que consiste em
5 hidrogênio, alquila e $-C(O)R^{10}$;

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, arila, heteroarila, $-C(O)R^{17}$ e $-C(O)R^{10}$;

R^6 e R^7 podem combinar-se para formar um grupo
10 selecionado a partir do grupo que consiste em $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ e $-(CH_2)_6-$;

com a condição de que pelo menos um dentre R^5 , R^6 ou R^7 deve ser $-C(O)R^{10}$;

R^{10} é selecionado a partir do grupo que consiste em
15 hidroxí, alcoxi, ariloxi, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ e $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila;

R^{12} é selecionado a partir do grupo que consiste em $-NR^{13}R^{14}$, hidroxí, $-C(O)R^{15}$, arila e heteroarila;

20 R^{13} e R^{14} são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, cianoalquila, cicloalquila, arila e heteroarila; ou

R^{13} e R^{14} podem combinar-se para formar um grupo heterocíclico;

25 R^{15} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, hidroxí, alcoxi e ariloxi;

R^{17} é selecionado a partir do grupo que consiste em alquila, cicloalquila, arila e heteroarila e

n é 1, 2, 3 ou 4.

De preferência, R^5 ou R^6 , no composto de fórmula (II) é $-C(O)R^{10}$;

R^6 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila, mais preferivelmente hidrogênio ou metila;

R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila, mais preferivelmente hidrogênio ou metila quando R^6 for $-COR^{10}$;

R^6 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila, mais preferivelmente hidrogênio ou metila quando R^5 for $-COR^{10}$;

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila e arila, mais preferivelmente hidrogênio, metila ou fenila;

R^{10} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, alcoxi, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ e $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila, mais preferivelmente hidrogênio ou metila;

R^{12} é selecionado a partir do grupo que consiste em $-NR^{13}R^{14}$;

R^{13} e R^{14} são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio ou alquila; ou

R^{13} e R^{14} podem combinar-se para formar um grupo heterocíclico e

n é 1, 2 ou 3.

Dentro dos grupos preferidos acima, os grupos de compostos intermediários mais preferidos são aqueles em que R^5 , R^6 , R^{11} , R^{12} , R^{13} ou R^{14} são independentemente grupos

descritos na seção intitulada "modalidades preferidas" abaixo.

Em um sétimo aspecto, esta invenção refere-se a métodos de preparação de compostos de Fórmula (I).

5 Finalmente, esta invenção refere-se também à identificação de um composto químico que module a atividade catalítica de uma proteína de quinase por contato de células que expressam tal proteína de quinase com um composto ou um sal da presente invenção e em seguida
10 monitorando as referidas células para um efeito.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

A não ser que mencionado de outro modo, os termos que se seguem utilizados na especificação e nas reivindicações
15 têm os significados discutidos abaixo:

"Alquila" refere-se a um radical de hidrocarbonetos saturados alifáticos que inclui grupos de cadeia reta e cadeia ramificada de 1 a 20 átomos de carbono (sempre que se mencionar aqui uma faixa numérica, por exemplo, "1-20",
20 isso significa que o grupo, neste caso o grupo de alquila, pode conter 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., até 20 átomos de carbono, inclusive). Os grupos de alquila que contêm de 1 a 4 átomos de carbono são denominados grupos de alquila inferior.
25 Quando os referidos grupos de alquila inferior não possuem substitutos, os mesmos são denominados grupos de alquila inferior não substituídos. Mais preferivelmente, um grupo de alquila é uma alquila de tamanho médio que possui 1 a 10 átomos de carbono, por exemplo, metila, etila, propila,
30 2-propila, n-butila, iso-butila, terc-butila, pentila e

similares. Mais preferivelmente, é uma alquila inferior que possui 1 a 4 átomos de carbono por exemplo, metila, etila, propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila e similares. O grupo de alquila pode ser substituído ou não-substituído.

5 Quando substituído, o(s) grupo(s) substituído(s) é(são), de preferência, um ou mais, mais preferivelmente um a três, ainda mais preferivelmente um a dois substituto(s) independentemente selecionados dentre o grupo que consiste em halo, hidroxí, alcoxi inferior não-substituído, arila

10 opcionalmente substituída por um ou mais grupos, de preferência um, dois ou três grupos que sejam grupos de halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído, ariloxi opcionalmente substituído por um ou mais grupos, de preferência um, dois ou três

15 grupos que sejam grupos de halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído independentemente entre si, heteroarila de 6 elementos com 1 a 3 átomos de nitrogênio no anel sendo os carbonos no anel opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de

20 preferência um, dois ou três grupos que sejam grupos de halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído, heteroarila de 5 elementos com 1 a 3 heteroátomos selecionados dentre o grupo que consiste em nitrogênio, oxigênio e enxofre, sendo os átomos de

25 carbono e nitrogênio no grupo opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de preferência um, dois ou três grupos de halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído, grupo heteroalíclico de 5- ou 6- elementos com 1 a 3 heteroátomos selecionados

30 dentre o grupo que consiste em nitrogênio, oxigênio e

enxofre, sendo os átomos de carbono e nitrogênio (se
 presentes) no grupo opcionalmente substituídos por um ou
 mais grupos, de preferência um, dois ou três grupos que
 sejam grupos de halo, hidroxí, alquila inferior não-
 5 substituída ou alcoxi inferior não-substituído
 independentes entre si, mercapto, (alquila inferior não-
 substituída) tio, ariltio opcionalmente substituídos por um
 ou mais grupos, de preferência um, dois ou três grupos de
 halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi
 10 inferior não-substituído independentes entre si, ciano,
 acila, tioacila, O-carbamila, N-carbamila, O-tiocarbamila,
 N-tiocarbamila, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-
 sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ e
 $-NR^{18}R^{19}$, em que R^{18} e R^{19} são independentemente
 15 selecionados dentre o grupo que consiste em hidrogênio,
 alquila inferior não-substituída, trihalometila,
 cicloalquila de (C_3-C_6) não-substituída, alquenila inferior
 não-substituída, alquinila inferior não-substituída e arila
 opcionalmente substituída por um ou mais grupos, de
 20 preferência um, dois ou três grupos que sejam grupos de
 halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi
 inferior não-substituído independente entre si.

De preferência, o grupo de alquila é substituído por
 um ou mais substitutos selecionados dentre o grupo que
 25 consiste em hidroxí, grupo heteroalíclico de 5- ou 6-
 elementos com 1 a 3 heteroátomos selecionados dentre o
 grupo que consiste em nitrogênio, oxigênio e enxofre, sendo
 os átomos de carbono e nitrogênio (se presentes) no grupo
 opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de
 30 preferência um, dois ou três grupos que sejam grupos de

halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído independentes entre si, heteroarila de 5- elementos com 1 a 3 heteroátomos selecionados dentre o grupo que consiste em nitrogênio, 5 oxigênio e enxofre, sendo os átomos de carbono e nitrogênio no grupo opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de preferência um, dois ou três grupos que sejam grupos halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído, heteroarila de 6- elementos com 1 10 a 3 átomos de nitrogênio no anel, sendo os carbonos no anel opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de preferência um, dois ou três grupos que sejam grupos de halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído, ou $-NR^{18}R^{19}$, em que R^{18} e R^{19} são 15 independentemente selecionados dentre o grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior não-substituída. Ainda mais preferivelmente o grupo de alquila é substituído por um ou dois substitutos que são hidroxí, dimetilamino, etilamino, dietilamino, dipropilamino, pirrolidino, piperidino, 20 morfolino, piperasino, 4-alquilpiperasino inferior, fenila, imidazolila, piridinila, piridazinila, pirimidinila, oxazolila, triazinila e similares.

"Cicloalquila" refere-se a um anel monocíclico de 3 a 8 elementos todos de carbono, um anel bicíclico fundido 25 todo de carbono de 5 elementos/6 elementos ou 6 elementos/6 elementos ou um anel fundido multicíclico (um sistema de anel "fundido" significa que cada anel no sistema compartilha um par adjacente de átomos de carbono com outro anel no sistema) em que um ou mais dos anéis pode conter

uma ou mais ligações duplas porém nenhum dos anéis tem um sistema de pi-elétrons completamente conjugados.

Exemplos, sem limitação, de grupos de cicloalquila são ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, 5 cicloexano, cicloexadieno, adamantano, cicloeptano, cicloeptatrieno e similares. Um grupo de cicloalquila pode ser substituído ou não-substituído. Quando substituído, o(s) grupo(s) substituído(s) é(são), de preferência, um ou mais, mais preferivelmente um ou dois substitutos 10 independentemente selecionados dentre o grupo que consiste em alquila inferior não-substituída, trialquila, halo, hidroxi, alcoxi inferior não-substituído, arila opcionalmente substituída por um ou mais grupos, de preferência um ou dois grupos que sejam grupos 15 independentes entre si de halo, hidroxi, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído, ariloxi opcionalmente substituído por um ou mais grupos, de preferência um ou dois grupos que sejam grupos de halo, hidroxi, alquila inferior não-substituída ou alcoxi 20 inferior não-substituído independentemente entre si, heteroarila de 6 elementos com 1 a 3 átomos de nitrogênio no anel sendo os carbonos no anel opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de preferência um ou dois grupos que sejam grupos independentes entre si de 25 halo, hidroxi, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído, heteroarila de 5 elementos com 1 a 3 heteroátomos selecionados dentre o grupo que consiste em nitrogênio, oxigênio e enxofre, sendo os átomos de carbono e nitrogênio no grupo opcionalmente substituídos 30 por um ou mais grupos, de preferência um ou dois grupos

independentes entre si de halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído, grupo heteroalíclico de 5 ou 6 elementos com 1 a 3 heteroátomos selecionados dentre o grupo que consiste em nitrogênio, oxigênio e enxofre, sendo os átomos de carbono e nitrogênio (se presentes) no grupo opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de preferência um ou dois grupos que sejam grupos de halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído independentes entre si, mercapto, alquiltio inferior não-substituído, ariltio opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de preferência um ou dois grupos de halo, hidroxí, alquila inferior não-substituída ou alcoxi inferior não-substituído independentes entre si, ciano, acila, tioacila, O-carbamila, N-carbamila, O-tiocarbamila, N-tiocarbamila, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, e $-NR^{18}R^{19}$, são como definidos acima.

"Alquenila" refere-se a um grupo de alquila inferior, como definido aqui, que consiste em pelo menos dois átomos de carbono e pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono. Exemplos representativos incluem etenila, 1-propenila, 2-propenila, 1-,2- ou 3-butenila e similares porém não se limitam aos mesmos.

"Alquinila" refere-se a um grupo de alquila inferior, como definido aqui, que consiste em pelo menos dois átomos de carbono e pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono. Exemplos representativos incluem etenila, 1-propenila, 2-propenila, 1-,2- ou 3-butenila e similares porém não se limitam aos mesmos.

"Arila" refere-se a um grupo monocíclico todo de carbono ou policíclico de anel fundido (isto é, anéis que compartilham pares adjacentes de átomos de carbono) de 1 a 12 átomos de carbono com um sistema de pi-elétrons completamente conjugados. Exemplos, sem limitação, de grupos de arila são fenila, naftalenila e atracenila. O grupo de arila pode ser substituído ou não-substituído. Quando substituído(s), o(s) grupo(s) substituído(s) é(são) de preferência um ou mais grupos, mais preferivelmente, um, dois ou três grupos, ainda mais preferivelmente um ou dois independentemente selecionados dentre o grupo que consiste em alquila inferior não-substituída, trialoalquila, halo, hidroxi, alcoxi inferior não-substituído, mercapto alquiltio inferior não-substituído, ciano, acila, tioacila, O-carbamila, N-carbamila, O-tiocarbamila, N-tiocarbamila, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, e $-NR^{18}R^{19}$, sendo R^{18} e R^{19} como definidos acima. De preferência, o grupo de arila é opcionalmente substituído por um ou dois substitutos independentemente selecionados dentre halo, alquila inferior não-substituída, trialoalquila, hidroxi, mercapto, ciano, N-amido, mono ou dialquilamino, carboxi, ou N-sulfonamido.

"Heteroarila" refere-se a um grupo monocíclico ou de anéis fundidos (isto é, anéis que compartilham um par adjacente de átomos) de 5 a 12 átomos de anel que contêm um, dois ou três heteroátomos de anel selecionados dentre N, O ou S, sendo os átomos de anéis remanescentes C e, além disso, tendo um sistema de pi-elétrons completamente conjugados. Exemplos, sem limitação, de grupos de

heteroarila não-substituída são pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirinidina, quinolina, isoquinolina, purina e carbazol. O grupo de heteroarila pode ser substituído ou não-substituído. Quando substituído(s), o(s) grupo(s) substituído(s) é(são) de preferência um ou mais grupos, mais preferivelmente, um, dois ou três grupos, ainda mais preferivelmente um ou dois independentemente selecionados dentre o grupo que consiste em alquila inferior não-substituída, trialoalquila, halo, hidroxí, alcoxi inferior não-substituído, mercapto alquiltio inferior não-substituído, ciano, acila, tioacila, O-carbamila, N-carbamila, O-tiocarbamila, N-tiocarbamila, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ e $-NR^{18}R^{19}$, sendo R^{18} e R^{19} como definidos acima. De preferência, o grupo de arila é opcionalmente substituído por um ou dois substitutos independentemente selecionados dentre halo, alquila inferior não-substituída, trialoalquila, hidroxí, mercapto, ciano, N-amido, mono ou dialquilamino, carboxi, ou N-sulfonamido.

"Heteroalícíclico" refere-se a um grupo monocíclico ou de anel fundido que possui no(s) anel(éis) 5 a 9 átomos de anel em que um ou dois átomos de anel são heteroátomos selecionados dentre N, O ou $S(O)_n$ (onde n é um inteiro de 0 a 2) sendo os átomos de anel remanescentes C. Os anéis também podem ter uma ou mais ligações duplas. Contudo, os anéis não têm um sistema de pi-elétrons completamente conjugados. Exemplos, sem limitação, de grupos heterocíclicos não-substituídos são pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, tiomorfolino,

homopiperazina e similares. O anel heteroalícíclico pode ser substituído ou não-substituído. Quando substituídos, o(s) grupo(s) substituído(s) é(são) de preferência um ou mais grupos, mais preferivelmente, dois ou três grupos, ainda mais preferivelmente um ou dois independentemente selecionados dentre o grupo que consiste em alquila inferior não-substituída, trialoalquila, halo, hidroxí, alcoxi inferior não-substituído, mercapto, alquiltio inferior não-substituído, ciano, acila, tioacila, O-carbamila, N-carbamila, O-tiocarbamila, N-tiocarbamila, C-amido, N-amido, nitro, N-sulfonamido, S-sulfonamido, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$, e $-NR^{18}R^{19}$, sendo R^{18} e R^{19} como definidos acima. De preferência, o grupo de arila é opcionalmente substituído por um ou dois substitutos independentemente selecionados dentre halo, alquila inferior não-substituída, trialoalquila, hidroxí, mercapto, ciano, N-amido, mono ou dialquilamino, carboxi, ou N-sulfonamido.

De preferência, o grupo de heteroalícíclico é opcionalmente substituído por um ou dois substitutos independentemente selecionados dentre halo, alquila inferior não-substituída, trialoalquila, hidroxí, mercapto, ciano, N-amido, mono ou dialquilamino, carboxi, ou N-sulfonamido.

"Heterociclo" significa um radical cíclico saturado de 3 a 8 átomos de anel em que um ou dois átomos de anel são heteroátomos selecionados dentre N, O ou $S(O)_n$ (onde n é um inteiro de 0 a 2) sendo os átomos de anéis remanescentes C, onde um ou dois átomos C podem ser opcionalmente substituídos por um grupo de carbonila. O

anel heterocíclico pode ser opcionalmente substituído independentemente por um, dois ou três substitutos selecionados dentre alquila inferior opcionalmente substituída (substituída por 1 ou 2 substitutos independentemente selecionados dentre carboxi ou éster), haloalquila, cianoalquila, halo, nitro, ciano, hidroxí, alcoxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, aralquila, heteroaralquila, -COR (onde R é alquila) ou -COOR (onde R é hidrogênio ou alquila). Mais especificamente o termo heterocíclico inclui tetraidropirânica, 2,2-dimetil-1,3-dioxolano, piperidino, N-metilpiperidino-3-ila, piperazino, N-metilpirrolidina-3-ila, 3-pirrolidino, morfolino, tiomorfolino, tiomorfolino-1-óxido, tiomorfolino-1,1-dióxido, 4-etiloxicarbonilpiperazino, 3-oxopiperazino, 2-imidazolidona, 2-pirrolidinona, 2-oxoomopiperazino, tetraidropirimidina-2-ona e seus derivados, porém não se limitam aos mesmos. De preferência, o grupo heterocíclico é opcionalmente substituído por um ou dois substitutos independentemente selecionados dentre halo, alquila inferior não-substituída, alquila inferior substituída por carboxi, éster hidroxí, mono ou dialquilamino.

"Hidroxí" refere-se a um grupo de -OH.

"Alcoxi" refere-se a um grupo de -O-(alquila não-substituída) e -O-(cicloalquila não-substituída). Exemplos representativos incluem, por exemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, ciclopropiloxi, ciclobutiloxi, ciclopentiloxi, cicloexiloxi e similares, porém não se limitam aos mesmos.

"Arioxi" refere-se a um grupo de -O-arila e -O-heteroarila, como definido aqui. Exemplos representativos

incluem fenoxi, piridiniloxi, furaniloxi, tieniloxi, pirimidiniloxi, piraziniloxi e similares e seus derivados, porém não se limitam aos mesmos.

"Mercapto" refere-se a um grupo de -SH.

5 "Alquiltio" refere-se a um grupo de -S-(alquila não-substituída) e -S-(cicloalquila não-substituída). Exemplos representativos incluem, por exemplo, metiltio, etiltio, propiltio, butiltio, ciclopropiltio, ciclobutiltio, ciclopentiltio, cicloexiltio e similares, porém não se
10 limitam aos mesmos.

"Ariltio" refere-se a um grupo de -S-arila e -S-heteroarila, como definido aqui. Exemplos representativos incluem feniltio, piridiniltio, furaniltio, tieniltio, piridiminiltio e similares e seus derivados, porém não se
15 limitam aos mesmos.

"Acila" refere-se a um grupo de $-C(O)-R''$, em que R'' é selecionado dentre o grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior não-substituída, trialometila, cicloalquila não-substituída, arila opcionalmente
20 substituída por um ou mais grupos, de preferência um, dois ou três substitutos selecionados dentre o grupo que consiste em alquila inferior não-substituída, trialometila, alcoxi inferior não-substituído e $NR^{18}R^{19}$, heteroarila (ligada através de um carbono de anel) opcionalmente
25 substituída por um ou mais grupos, de preferência um, dois ou três substitutos selecionados dentre o grupo que consiste em grupos de alquila inferior não-substituída, trialometila, alcoxi inferior não-substituído, halo e $NR^{18}R^{19}$ e heterocíclicos (ligados através de um átomo de
30 anel) opcionalmente substituídos por um ou mais grupos, de

preferência um, dois ou três substitutos selecionados dentre o grupo que consiste em alquila inferior não-substituída, trialometila, alcoxi inferior não-substituído, halo e $\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$. Exemplos representativos de acila incluem acetila, trifluoracetila, benzoíla e similares, porém não se limitam aos mesmos

"Aldeído" refere-se a um grupo de acila em que R'' é hidrogênio.

"Tioacila" refere-se a um grupo de $-\text{C}(\text{S})-\text{R}''$, com R'' como definido aqui.

"Éster" refere-se a um grupo de $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{R}''$ sendo R'' como definido aqui exceto que R'' não pode ser hidrogênio.

Grupo de "acetila" refere-se a um grupo de $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$.

Grupo de "halo" refere-se a fluor, cloro, bromo ou iodo, de preferência fluor ou cloro.

O grupo de "trialometila" refere-se a um grupo de $-\text{CX}_3$ em que X é um grupo de halo como definido aqui.

Grupo de "trialometanossulfonila" refere-se a um grupo de $\text{X}_3\text{CS}(=\text{O})_2-$ em que X é como definido acima.

"Ciano" refere-se a um grupo de $-\text{C}\equiv\text{N}$.

"Metilenodioxí" refere-se a um grupo de $-\text{OCH}_2\text{O}-$ em que os dois átomos de oxigênio estão ligados a átomos de carbono adjacentes.

O grupo de "etilenodioxí" refere-se a $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ onde os dois átomos de oxigênio estão ligados a átomos de carbono adjacentes.

"S-sulfonamido" refere-se a um grupo de $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ em que R^{18} e R^{19} são como definidos aqui.

"N-sulfonamido" refere-se a um grupo de $-\text{NR}^{18}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{19}$ em que R^{18} e R^{19} são como definidos aqui.

O grupo de "O-carbamila" refere-se a um grupo de $-\text{OC}(\text{O}) \text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ em que R^{18} e R^{19} são como definidos aqui.

"N-carbamila" refere-se a um grupo de $\text{R}^{18}\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{19}$ em que R^{18} e R^{19} são como definidos aqui.

5 "O-tiocarbamila" refere-se a um grupo de $-\text{OC}(\text{S}) \text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ em que R^{18} e R^{19} são como definidos aqui.

"N-tiocarbamila" refere-se a um grupo de $\text{R}^{18}\text{OC}(\text{S})\text{NR}^{19}$ em que R^{18} e R^{19} são como definidos aqui.

"Amino" refere-se a um grupo de $\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ em que R^{18} e R^{19}
10 são ambos hidrogênio.

"C-amido" refere-se a um grupo de $-\text{C}(\text{O}) \text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ em que R^{18} e R^{19} são como definidos aqui.

"N-amido" refere-se a um grupo de $\text{R}^{18}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{19}-$, em que R^{18} e R^{19} são como definidos aqui.

15 "Nitro" refere-se a um grupo de $-\text{NO}_2$.

"Haloalquila" significa uma alquila não-substituída, de preferência alquila inferior não-substituída como definido acima, que é substituída por um ou mais átomos de halo iguais ou diferentes, por exemplo, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CF}_3$,
20 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$ e similares.

"Aralquila" significa uma alquila não-substituída, de preferência alquila inferior não-substituída como definido acima que é substituída por um grupo de arila como definido acima, por exemplo, $-\text{CH}_2$ fenila, $-(\text{CH}_2)_2$ fenila, $-(\text{CH}_2)_3$
25 fenila, $-\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ fenila e similares e seus derivados.

O grupo de "heteroalquila" significa uma alquila não-substituída, de preferência alquila inferior não-substituída como definido acima, que é substituída por um grupo de heteroarila, por exemplo, $-\text{CH}_2$ piridinila, $-(\text{CH}_2)_2$

pirimidinila, $-(CH_2)_3$ imidazolila e similares e seus derivados.

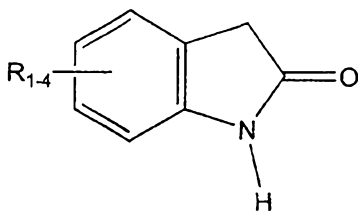
"Monoalquilamino" refere-se a um radical $-NHR$ onde R é um grupo de alquila não-substituída ou cicloalquila não-substituída como definido acima, por exemplo metilamino, (1-metiletil)amino, cicloexilamino e similares.

"Dialquilamino" refere-se a um radical $-NHR$ onde R é independentemente um grupo de alquila não-substituída ou cicloalquila não-substituída como definido acima, por exemplo dimetilamino, dietilamino, (1-metiletil)-etilamino, cicloexiletilamino, ciclopentilmetilamino e similares.

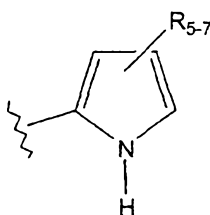
"Cianoalquila" significa uma alquila não-substituída, de preferência alquila inferior não-substituída como definido acima que é substituída por 1 ou 2 grupos de ciano.

"Opcional" ou "opcionalmente" significa que o evento ou circunstância descritos subsequenteiramente podem ocorrer embora não necessariamente, e que a descrição inclui casos em que o evento ou circunstância ocorrem e casos em que não ocorrem. Por exemplo, "grupo heterocíclico opcionalmente substituído por um grupo de alquila" significa que a alquila pode estar presente embora não necessariamente, e a descrição inclui situações em que o grupo heterocíclico é substituído por um grupo de alquila e situações em que o grupo heterocíclico não é substituído pelo grupo de alquila.

Os termos "2-indolinina", "indolin-2-ona" e "2-oxindola" são utilizados de modo permutável aqui para referirem-se a uma molécula com a estrutura química:



O termo "pirrol" refere-se a uma molécula que possui a estrutura química:



5 Os termos "2-indolinona substituída por pirrol" e "3-pirrolidenil-2-indolinona" são usados de modo permutável aqui para referirem-se a um composto químico que possui a estrutura genérica mostrada na Fórmula (I).

Compostos que possuam a mesma fórmula molecular mas
 10 difiram no tipo ou seqüência de ligação de seus átomos ou na organização dos seus átomos no espaço são denominados "isômeros". Isômeros que diferem na organização dos seus átomos no espaço são denominados "estereoisômeros". Estereoisômeros que não sejam imagens refletidas uns dos
 15 outros são denominados "diasterômeros" e aqueles que são imagens refletidas não superimpostas umas das outras são denominados "enantiômeros". Quando um composto tem um centro assimétrico, por exemplo, está ligado a quatro grupos diferentes, é possível um par de enantiômeros. Um
 20 enantiômero pode ser caracterizado pela configuração absoluta do seu centro assimétrico e é descrito pelas regras de seqüenciamento R- e S- de Cahn e Prelog, ou pelo

modo em que a molécula gira o plano da luz polarizada e designada como dextrogiro ou levogiro (isto é, como isômeros (+) ou (-), respectivamente). Um composto quiral pode existir ou como enantiômero individual ou como uma
5 mistura dos mesmos. Uma mistura que contenha proporções iguais dos enantiômeros é denominada "mistura racêmica".

Os compostos desta invenção podem possuir um ou mais centros assimétricos; por conseguinte tais compostos podem ser produzidos como estereoisômeros (R)- ou (S)-
10 individuais ou como suas misturas. Por exemplo, se o substituto R^6 em um composto de fórmula (I) for 2-hidroxietila, então o carbono ao qual o grupo de hidroxí está ligado é um centro assimétrico e portanto o composto de Fórmula (I) pode existir como um estereoisômero (R)- ou
15 (S)-. A não ser que indicado de outro modo, a descrição ou citação de um composto específico na especificação e nas reivindicações destina-se a incluir tanto enantiômeros individuais como misturas, racêmicas ou não, dos mesmos. Os métodos para a determinação de estereoquímica e a separação
20 de estereoisômeros são bem conhecidos na técnica (vide relato no Capítulo 4 de "Advanced Organic Chemistry", (Química Orgânica Avançada) 4ª Edição J. March, John Willey and Sons, New York, 1992).

Os compostos de Fórmula (I) podem apresentar os
25 fenômenos de tautomerismo e isomerismo estrutural. Por exemplo, os compostos descritos aqui podem adotar uma configuração em E ou Z em torno da ligação dupla que conecta a porção 2-indolinona à porção pirrol ou podem ser uma mistura de E e Z. Esta invenção abrange qualquer forma
30 tautomérica ou isomérica estrutural e misturas das mesmas

que possuam a capacidade de regular a atividade RPK, CTK e/ou STK e não se limita a qualquer uma das formas tautomérica ou isométrica estrutural.

Uma "composição farmacêutica" refere-se a uma mistura
5 de um ou mais dos compostos descritos aqui, ou a sais fisiologicamente/farmacologicamente aceitáveis ou pró-drogas dos mesmos, com outros componentes químicos, tais como carreadores e excipientes fisiologicamente/farmacologicamente aceitáveis. A finalidade de uma composição
10 farmacêutica é facilitar a administração de um composto a um organismo.

O composto de Fórmula (I) também pode atuar como uma pró-droga. Uma "pró-droga" refere-se a um agente que é convertido na droga matriz *in vivo*. Pró-drogas são muitas
15 vezes úteis uma vez que, em algumas situações, podem ser mais fáceis de administrar do que a droga matriz. Por exemplo, as mesmas podem ser biodisponíveis por administração oral enquanto que a droga matriz não. A pró-droga também pode ter maior solubilidade em composições
20 farmacêuticas em relação à droga matriz. Um exemplo, sem limitação, de uma pró-droga seria um composto da presente invenção que é administrado como um éster (a "pró-droga") para facilitar a transmissão através de uma membrana da célula onde a solubilidade em água é prejudicial à
25 mobilidade, porém é metabolicamente hidrolisada no ácido carboxílico, a entidade ativa, quando no interior da célula onde a solubilidade em água é benéfica.

Um outro exemplo de uma pró-droga poderia ser um polipeptídeo curto, por exemplo, sem limitação um
30 polipeptídeo de 2-10 aminoácidos, ligado através de um

grupo de amino terminal a um grupo de carboxi de um composto desta invenção em que o polipeptídeo é hidrolisado ou metabolizado *in vivo* para liberar a molécula ativa. As pró-drogas de um composto de fórmula (I) estão dentro do
5 âmbito desta invenção.

Além disso, considera-se que um composto de fórmula (I) seria metabolizado por enzimas no corpo do organismo tal como um ser humano para gerar um metabolito que possa regular a atividade das proteínas quinases. Tais
10 metabolitos estão dentro do âmbito da presente invenção.

Como usado aqui, um "carreador fisiologicamente/farmacologicamente aceitável" refere-se a um carreador ou diluente que não provoque irritação significativa a um organismo e que não anule a atividade
15 biológica e as propriedades do composto administrado.

Um "excipiente farmacologicamente aceitável" refere-se a uma substância inerte adicionada a uma composição farmacêutica para facilitar ainda mais a administração de um composto. Exemplos, sem limitação, de excipientes
20 incluem carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, diversos açúcares e tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais e glicóis de polietileno.

Como usado aqui, o termo "sal farmacologicamente aceitável" refere-se àqueles sais que retêm a eficácia
25 biológica e as propriedades do composto matriz. Tais sais incluem:

(i) sal de adição ácido que é obtido através da reação da base livre do composto matriz com ácidos inorgânicos tais como ácido hidrolórico, ácido hidrobrômico, ácido
30 nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico e ácido

perclórico e similares ou com ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido oxálico, ácido málico (D) ou (L), ácido maléico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido *p*-toluenossulfônico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido sucínico ou ácido malônico e similares, de preferência ácido hidrolórico ou ácido málico (L)- tal como o sal L-malato de (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-(5-flúor-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1*H*-pirrole-3

10 carboxílico ou

(ii) sais formados quando um próton ácido presente no composto matriz ou é substituído por um íon metálico, por exemplo, um íon de metal alcalino, um íon alcalino terroso ou íon de alumínio ou é coordenado com uma base orgânica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina e similares.

15

"PK" refere-se a receptor de proteína tirosina quinase (RTKs), não receptor ou tirosina quinase celular (CTKs) e serinas-treoninas quinases (STKs).

20 "Método" refere-se a modos, meios, técnicas e processos para realizar uma determinada tarefa que incluem aqueles modos, meios, técnicas e processos que são do conhecimento de profissionais das áreas química, farmacêutica, biológica, bioquímica e médica ou que podem ser facilmente desenvolvidas pelos mesmos a partir de

25 modos, meios, técnicas e processos conhecidos.

"Regulação" ou "regulador" refere-se à alteração da atividade catalítica de RTKs, CTKs e STKs. Em particular, regulador refere-se à ativação da atividade catalítica de

30 RTKs, CTKs e STKs, de preferência à ativação ou inibição da

atividade catalítica de RTKs, CTKs e STKs, dependendo da concentração do composto ou sal ao qual as RTKs, CTKs ou STKs é exposta ou, mais preferivelmente, à inibição da atividade catalítica das RTKs, CTKs e STKs.

5 "Atividade catalítica" refere-se à taxa de fosforilação da tirosina sob a influência direta ou indireta das RTKs e/ou CTKs ou da fosforilação de serina e treonina sob a influência direta ou indireta das STKs.

10 "Contato" refere-se à união de um composto desta invenção com um PK alvo de tal modo que o composto possa afetar a atividade catalítica da PK, ou diretamente, isto é, mediante interação com a própria quinase, ou indiretamente, isto é, mediante interação com outra molécula da qual depende a atividade catalítica de quinase.

15 Tal "contato" pode ser realizado "*in vitro*" isto é em um tubo de ensaio, uma placa de petri, ou similar. Em um tubo de ensaio, o contato pode incluir apenas um composto e um PK importante ou pode incluir células completas. As células também podem ser mantidas ou desenvolvidas em placas para
20 cultura de células e contatadas com um composto naquele ambiente. Neste contexto, é tentada a capacidade de um composto específico para afetar uma enfermidade relacionada com PK, isto é, o IC_{50} , definido abaixo, pode ser determinado antes da utilização dos compostos *in vivo* com
25 organismos vivos mais complexos. Para células fora do organismo, existem diversos métodos conhecidos daqueles versados na técnica para colocar as PKs em contato com os compostos que incluem a microinjeção direta nas células e diversas técnicas de carreador de transmembrana, porém não
30 se limitam aos mesmos.

"*In vitro*" refere-se a procedimentos realizados em um ambiente artificial tal como, por exemplo, sem limitação, em um tubo de ensaio ou meio de cultura.

"*In vivo*" refere-se a procedimentos realizados dentro
5 de um organismo vivo tal como, sem limitação, um camundongo, rato ou coelho.

"Enfermidade relacionada com PK", "enfermidade provocada por PK" e "atividade de PK anormal" referem-se todas elas a uma condição caracterizada por atividade
10 catalítica de PK inadequada, isto é abaixo ou geralmente acima, em que a PK específica pode ser uma RTK, uma CTK ou uma STK. A atividade catalítica inadequada pode surgir como resultado d: (1) expressão de PK em células que normalmente não expressam PKs, (2) maior expressão de PK conduzindo a
15 proliferação, diferenciação e/ou desenvolvimento indesejados de células, ou (3) menor expressão de PK conduzindo a reduções indesejadas na proliferação, diferenciação e/ou desenvolvimento de células. A superatividade de uma PK refere-se ou à amplificação da
20 codificação dos genes de uma PK específica ou produção de um nível de atividade de PK que possa estar relacionada com uma enfermidade provocada por proliferação, diferenciação e/ou desenvolvimento de células (isto é, à medida que o nível da PK aumenta, aumenta a gravidade de um ou mais dos
25 sintomas da enfermidade celular). Subatividade é evidentemente o contrário, em que a gravidade de um ou mais sintomas de uma enfermidade celular aumenta à medida que diminui o nível da atividade do PK.

"Tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se a um
30 método de minorar ou anular uma enfermidade celular

provocada por PK e/ou seus sintomas associados. Com relação especificamente ao câncer, estes termos significam apenas que a expectativa de vida de um indivíduo com câncer será aumentada ou que um ou mais dos sintomas da doença serão
5 reduzidos.

"Organismo" refere-se a qualquer ser vivo que compreenda pelo menos uma célula. Um organismo vivo pode ser por exemplo tão simples quanto uma célula eucariótica única ou tão complexo quanto um mamífero incluindo um ser
10 humano.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se àquela quantidade do composto que é administrada e que aliviará até certo ponto um ou mais dos sintomas da enfermidade sendo tratada. Em relação ao tratamento do câncer, uma
15 quantidade terapeuticamente eficaz refere-se àquela quantidade que tem o efeito de:

(1) reduzir o tamanho do tumor;

(2) inibir (isto é retardar até certo ponto, de preferência interromper) metástases tumorais;

20 (3) inibir até certo ponto (isto é, retardar até certo ponto, de preferência interromper) o crescimento do tumor e/ou;

(4) aliviar até certo ponto (ou, de preferência, eliminar) um ou mais sintomas associados ao câncer.

25 "Monitorar" significa observar ou detectar o efeito do contato de um composto com uma célula que expresse uma PK específica. O efeito observado ou detectado pode ser uma alteração no fenótipo da célula, na atividade catalítica de uma PK ou uma alteração na interação de uma PK com um co-

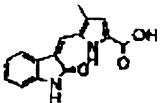
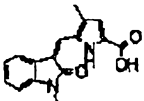
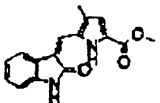
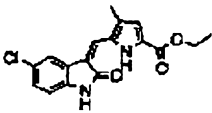
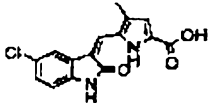
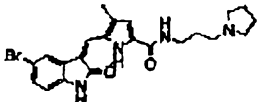
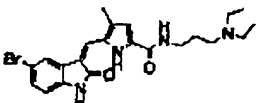
participante de ligação natural. As técnicas para observar ou detectar tais efeitos são bem conhecidas na técnica.

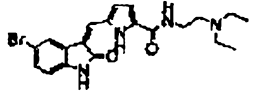
O efeito mencionado acima é selecionado dentre uma alteração ou uma ausência de alteração em um fenótipo de
5 célula, uma alteração ou ausência de alteração na atividade catalítica da referida proteína de quinase ou uma alteração ou ausência de alteração na interação da referida proteína de quinase com um co-participante de ligação natural em um aspecto final desta invenção.

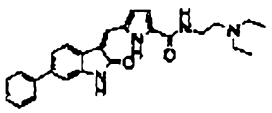
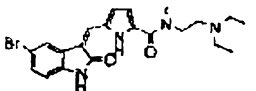
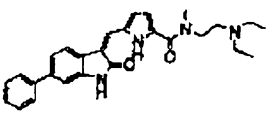
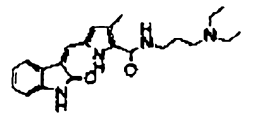
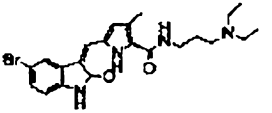
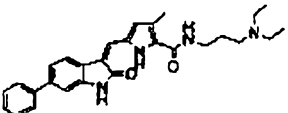
10 "Fenótipo da célula" refere-se a um aspecto externo de uma célula ou tecido da função biológica da célula ou tecido. Exemplos, sem limitação, de um fenótipo da célula são o tamanho da célula, aumento da célula, proliferação da célula, diferenciação da célula, sobrevivência da célula,
15 apoptose e absorção e utilização de nutrientes. Tais características fenotípicas são mensuráveis através de técnicas bem conhecidas na técnica.

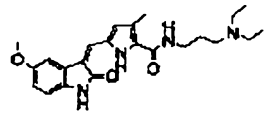
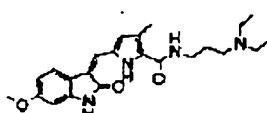
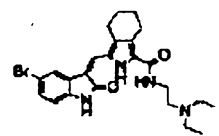
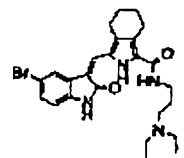
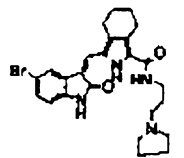
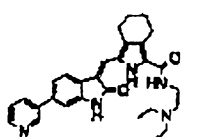
"Co-participante de ligação natural" refere-se a um polipeptídeo que se aglutina a uma PK específica em uma
20 célula. Os co-participantes de ligação natural podem ser importantes na propagação de um sinal em um processo de transdução de sinais mediados por PK. Uma alteração na interação do co-participante de ligação natural com a PK pode manifestar-se como uma concentração maior ou menor do
25 complexo PK/co-participante de ligação natural e, como consequência, em uma alteração visível na capacidade da PK na mediação da transdução dos sinais.

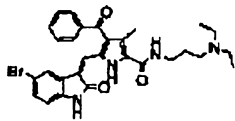
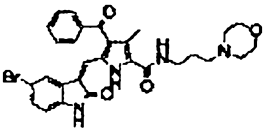
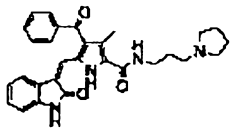
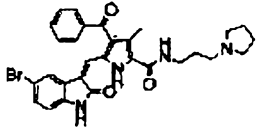
Compostos representativos da presente invenção são mostrados na Tabela 1 abaixo.

Exemplo	Estrutura	Nome
1		Ácido 4-metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
2		Ácido 4-metil-5-(1-metil-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilideno-metil)-1H-pirrol-2-carboxílico
3		Éster metílico de ácido 4-metil-5-(2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
4		Éster etílico de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
5		Ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
6		(3-Pirrolidin-1-il-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
7		(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

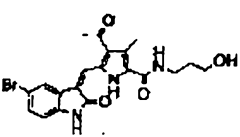
8		(2-Diethylaminoetil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
---	---	---

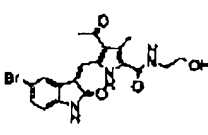
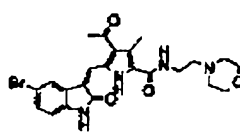
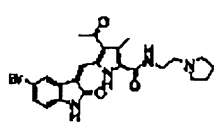
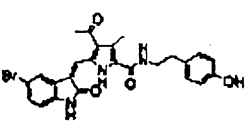
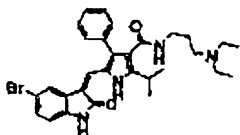
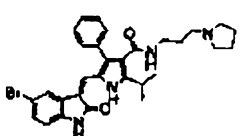
9		(2-Diethylaminoetil)amida de ácido 5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
10		(2-Diethylaminoetil)-metilamida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
11		(2-Diethylaminoetil)metilamida de ácido 5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
12		(3-Diethylaminopropil)amida de ácido 3-metil-5-(2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
13		(3-Diethylamino-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
14		(3-Diethylaminopropil)amida de ácido 3-metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

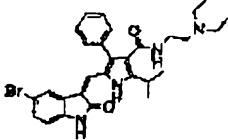
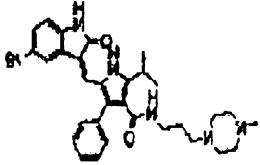
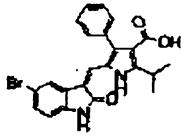
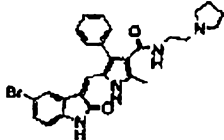
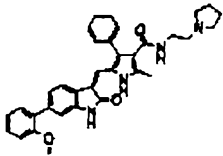
15		(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 5-(5-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
16		(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 5-(6-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
17		(2-Dietilamino-etil)amida de ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
18		(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
19		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
20		(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 3-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

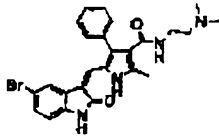
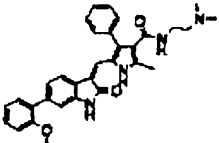
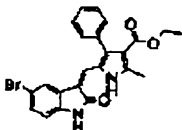
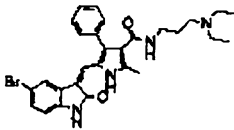
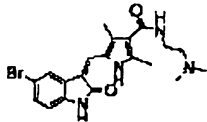
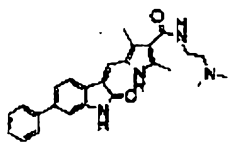
21		(3-Diethylaminopropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
22		(3-Morfolin-4-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
23		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-3-metil-5-(2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
24		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

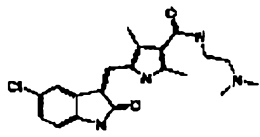
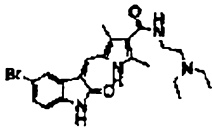
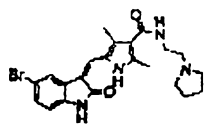
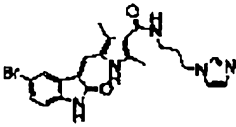
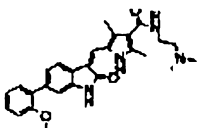
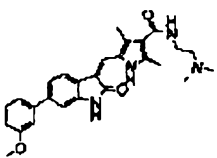
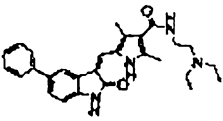
25		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-3-metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico
26		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(6-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pir-rol-2-carboxílico
27		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pir-rol-2-carboxílico
28		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pir-rol-2-carboxílico
29		(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-car-boxílico
30		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
31		(3-Morfolin-4-ilpropil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-car-boxílico

32		(3-Hidroxipropil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
----	---	---

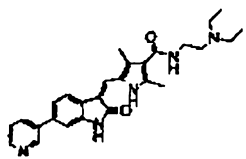
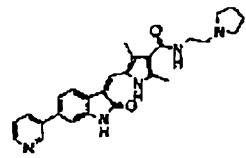
33		(2-Hidroxietyl)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
34		(2-Morfolin-4-iletil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
35		(2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
36		[2-(4-Hidroxifenil)etil]amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico
37		(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
38		(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-

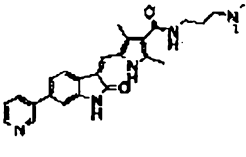
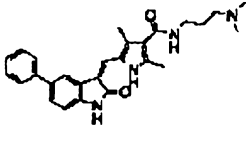
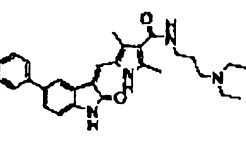
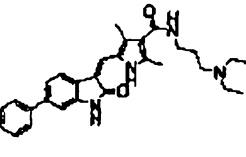
		carboxílico
39		(2-Diethylaminoetil) amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
40		[3-(4-Metilpiperazin-1-il)propil] amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
41		Ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
42		2-Pirrolidin-1-iletil) amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
43		(2-Pirrolidin-1-iletil) amida de ácido 5-[6-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

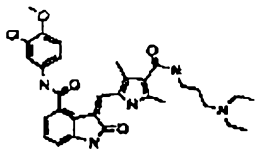
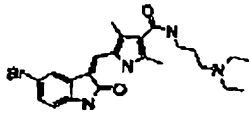
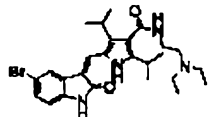
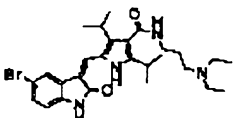
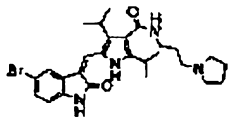
44		(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
45		(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 5-[6-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
46		Éster etílico de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
47		(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
48		(2-Dimetilamino-etil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
49		(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

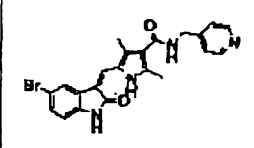
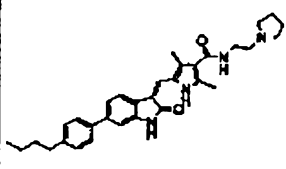
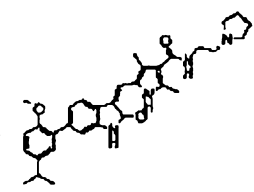
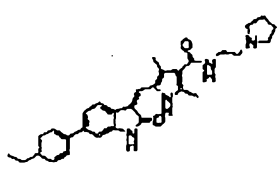
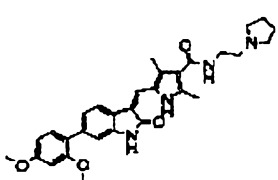
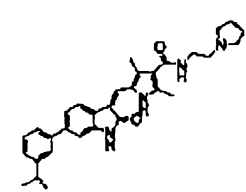
50		(2-Dimetilamino-etil)amida de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
51		(2-Dietilamino-etil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
52		(2-Pirrolidin-1-il-etil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
53		(3-Imidazol-1-il-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
54		(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 5-[6-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
55		(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 5-[6-(3-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
56		(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

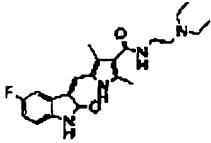
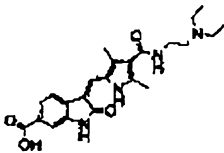
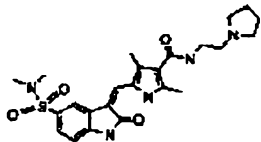
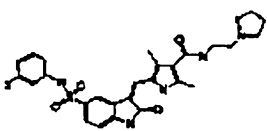
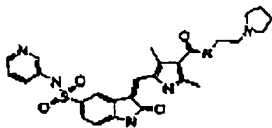
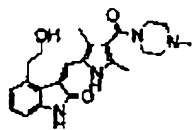
57		(2-pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
58		(3-Imidazol-1-ilpropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
59		(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
60		(2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
61		(3-Imidazol-1-ilpropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
62		(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-[6-(3,5-diclorofenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

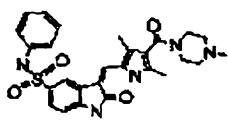
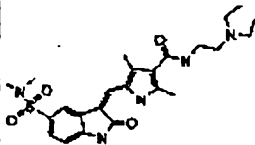
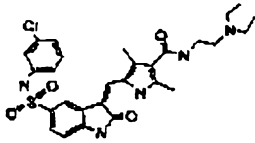
63		(2-Diethylaminoetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
64		(2-Pirrolidin-1-iletel)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

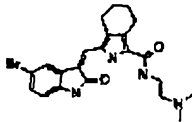
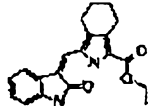
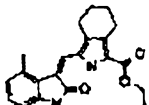
65		(3-Dimetilaminopropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
66		(3-Dimetilaminopropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
67		(3-Diethylaminopropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
68		(3-Diethylaminopropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-

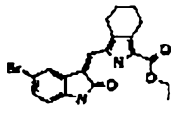
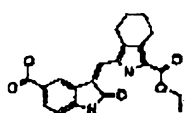
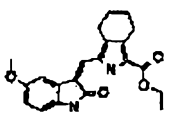
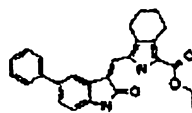
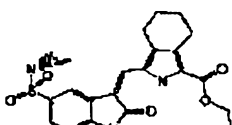
		carboxílico
69		(3-Cloro-4-metoxifenil) amida de ácido 3-[4-(3-dietilamino-propilcarbamoyl)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-4-carboxílico
70		(3-Dietilaminopropil) amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
71		(2-Dietilaminoetil) amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico
72		(3-Dietilamino-propil) amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico
73		(3-Pirrolidin-1-ilpropil) amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico

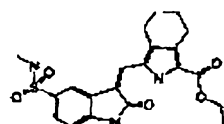
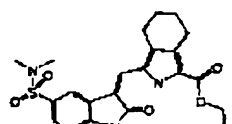
74		(Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
75		(2-Pirrolidin-1-iletetil)amida de ácido 5-[6-(4-butilfenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
76		(2-Pirrolidin-1-iletetil)amida de ácido 5-[6-(5-isopropil-2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
77		(2-Pirrolidin-1-iletetil)amida de ácido 5-[6-(4-etilfenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
78		(2-Pirrolidin-1-iletetil)amida de ácido 5-[6-(2,4-dimetoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
79		(2-Pirrolidin-1-iletetil)amida de ácido 5-[6-(3-isopropilfenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

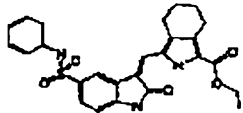
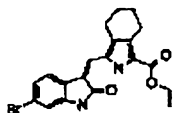
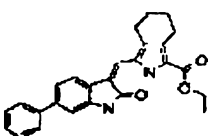
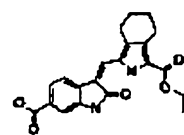
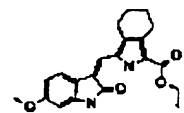
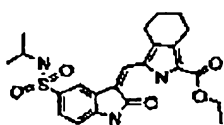
80		(2-Diethylamino-etil)amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
81		Ácido 3-[4-(2-dietilaminoetilcarbamoil)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico
82		2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-(5-dimetilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
83		(2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-[5-(3-clorofenilsulfamoil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
84		(2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-5-(piridin-3-ilsulfamoil)-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico
85		3-[3,5-Dimetil-4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-4-(2-hidroxietil)-1,3-diidroindol-2-ona

86		Fenilamida de ácido 3-[3,5-dimetil-4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico
87		(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-(5-dimetilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
88		(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-[5-(3-clorofenilsulfamoil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

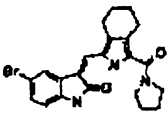
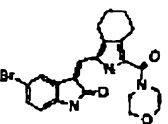
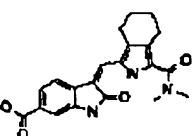
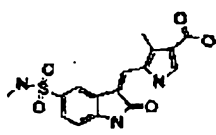
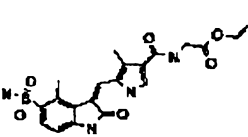
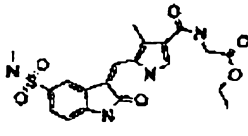
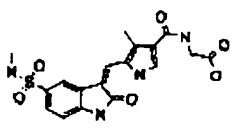
89		(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 3-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
90		Éster etílico de ácido 3-(2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
91		Éster etílico de ácido 3-(4-metil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

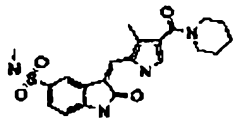
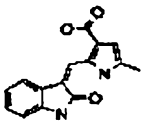
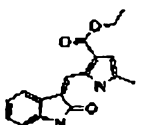
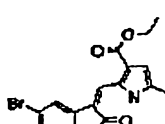
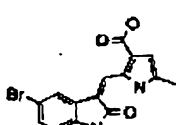
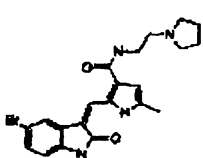
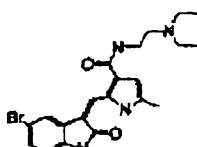
92		Éster etílico de ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
93		Ácido 3-(3-etoxicarbonil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-carboxílico
94		Éster etílico de ácido 3-(5-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
95		Éster etílico de ácido 3-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
96		Éster etílico de ácido 3-(2-oxo-5-sulfamoil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

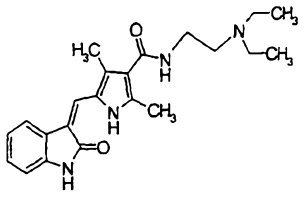
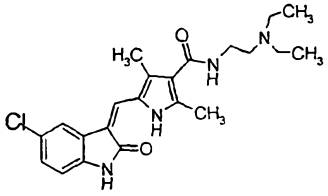
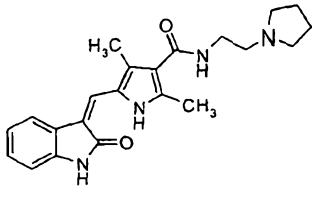
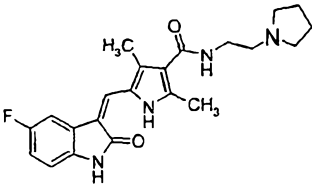
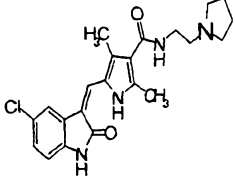
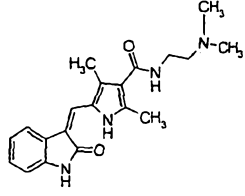
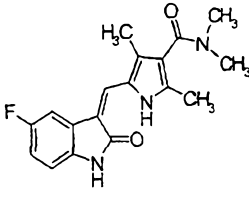
97		Éster etílico de ácido 3-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
98		Éster etílico de ácido 3-(5-dimetilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-

		carboxílico
99		Éster etílico de ácido 3-(2-oxo-5-fenilsulfamoil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
100		Éster etílico de ácido 3-(6-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
101		Éster etílico de ácido 3-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
102		Ácido 3-(3-etoxicarbonil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico
103		Éster etílico de ácido 3-(6-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
104		Éster etílico de ácido 3-(5-isopropilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

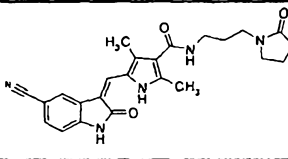
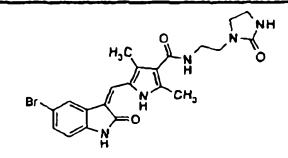
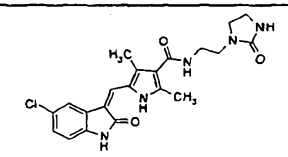
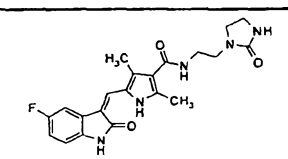
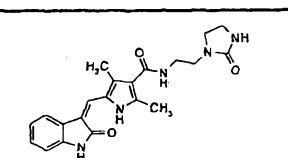
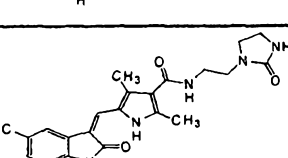
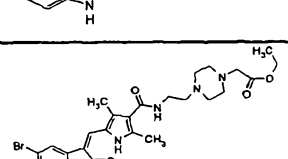
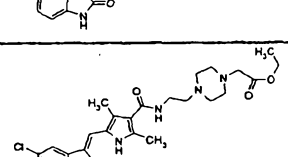
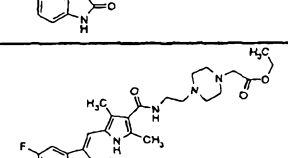
105		Ácido 3-(3-metilcarbonil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-carboxílico
106		Ácido 3-(3-dimetilcarbonil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico
107		Ácido 2-oxo-3-[3-(pirrolidina-1-carbonil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-2,3-diidro-1H-indol-5-carboxílico
108		Ácido 3-(3-morfolina-4-carbonil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-carboxílico
109		Ácido 3-[3-(morfolina-4-carbonil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico
110		Metilamida de ácido 3-(3-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico
111		Dimetilamida de ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

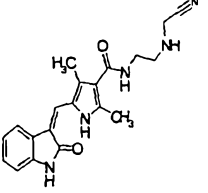
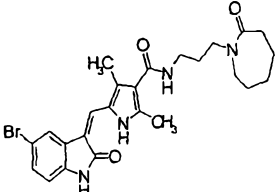
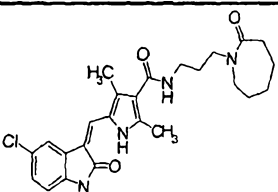
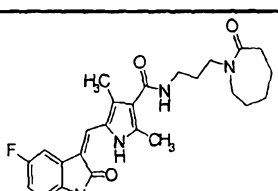
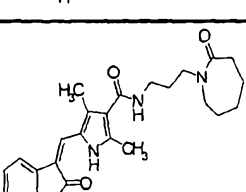
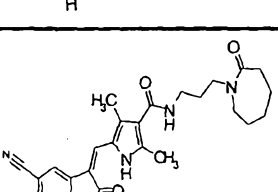
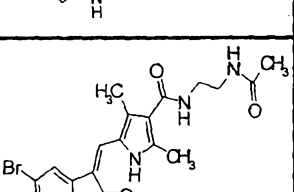
112		5-Bromo-3-[3-(pirrolidina-1-carbonil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-1,3-diidro-indol-2-ona
113		5-Bromo-3-[3-(morfolina-4-carbonil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-1,3-diidro-indol-2-ona
114		Ácido 3-(3-dimetilcarbamoil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico
115		Ácido 4-metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
116		Éster etílico de ácido {[4-metil-5-(4-metil-5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético
117		Éster etílico de ácido {[4-metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético
118		Ácido {[4-metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético

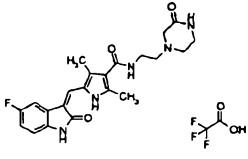
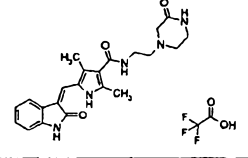
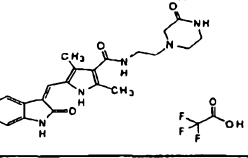
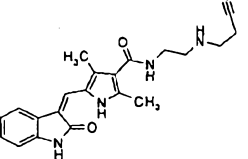
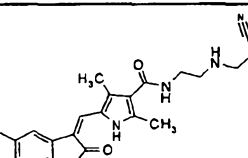
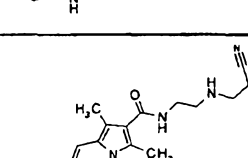
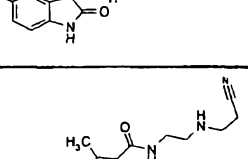
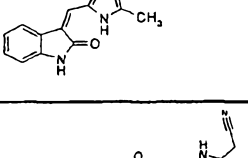
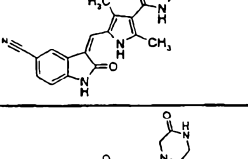
119		Metilamida de ácido 3-[3-metilo-4(piperidina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilidenometil]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico
120		Ácido 5-metil-2-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
121		Éster etílico de ácido 5-metil-2-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico
122		Éster etílico de ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico
123		Ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico
124		(2-Pirrolidin-1-iletil)-amida de ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico
125		(2-Dietilaminoetil)-amida de ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

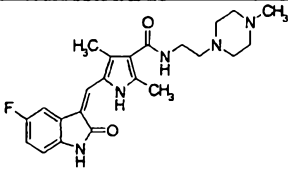
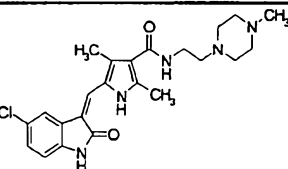
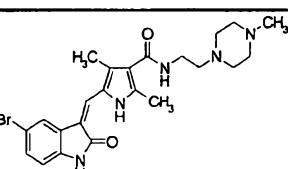
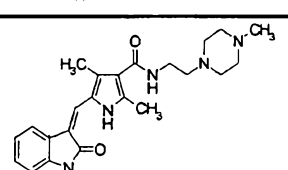
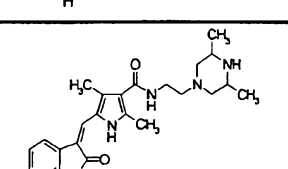
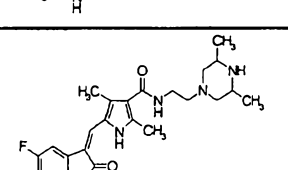
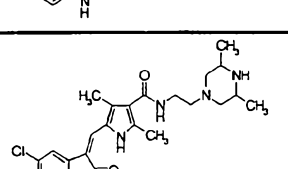
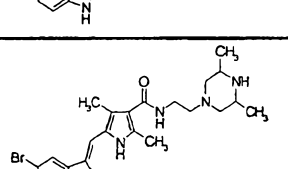
126		(2-diethylamino-etil)-amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirid-3-carboxílico	381 [M+1]
127		(2-diethylamino-etil)-amida de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirid-3-carboxílico	415 [M+1]
128		(2-pirrolidin-1-etil)-amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirid-3-carboxílico	379 [M+1]
129		(2-pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirid-3-carboxílico	397 [M+1]
130		(2-pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirid-3-carboxílico	413 [M+1]
131		(2-dimetilaminoetil)-amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirid-3-carboxílico	363 [M+1]
132		(2-dimetilaminoetil)-amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirid-3-carboxílico	371 [M+1]

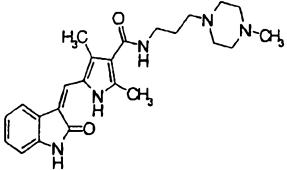
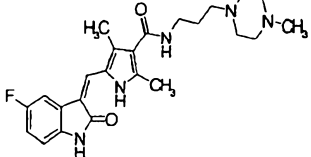
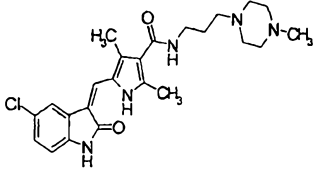
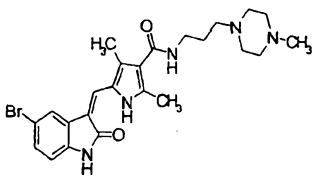
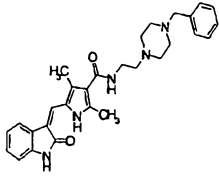
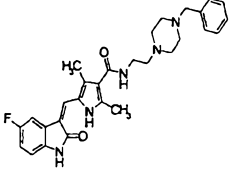
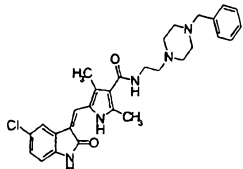
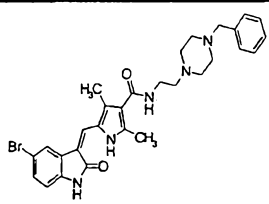
133		(2-acetilamino-etil)-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	399 [M-1]
134		(2-acetilamino-etil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	383 [M-1]
135		(2-acetilamino-etil)-amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico	365 [M-1]
136		[3- (2-oxo-tetraidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	500 [M+1] 502 [M+1]
137		[3- (2-oxo-tetraidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	454 [M-1]
138		[3- (2-oxo-tetraidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	438 [M-1]
139		[3- (2-oxo-tetraidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico	422 [M+1]
140		[3- (2-oxo-tetraidro-pirimidin-1-il)-propil]-amida de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	447 [M+1]
141		trifluoro-acetato de 4-[2-({5-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-ol	486 [M+1] 488 [M+1]

142		[3-(2-oxo-pirrolidin-1-il)-propil]- amida de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2- diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4- dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	430 [M-1]
143		[2-(2-oxo-imidazolin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2- diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4- dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	470 [M-1] 472 [M-1]
144		[2-(2-oxo-imidazolin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro- indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil- 1H-pirrol-3-carboxílico	428 [M+1]
145		[2-(2-oxo-imidazolin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro- indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil- 1H-pirrol-3-carboxílico	412 [M+1]
146		[2-(2-oxo-imidazolin-1-il)-etil]-amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2- diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H- pirrol-3-carboxílico	392 [M-1]
147		[2-(2-oxo-imidazolin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro- indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil- 1H-pirrol-3-carboxílico	419 [M+1]
148		éster etílico de ácido {4-[2-({5-[5- bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)- ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol- 3-carbonil}-amino)-etil]-piperazin-1- il}-acético	558 [M+1] 560 [M+1]
149		éster etílico de ácido {4-[2-({5-[5- cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)- ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol- 3-carbonil}-amino)-etil]-piperazin-1- il}-acético	514 [M+1]
150		éster etílico de ácido {4-[2-({5-[5- fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)- ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol- 3-carbonil}-amino)-etil]-piperazin-1- il}-acético	498 [M+1]

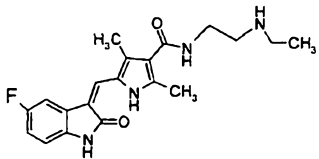
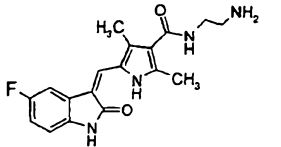
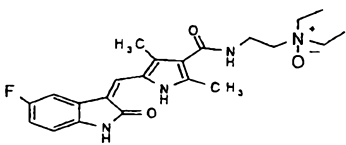
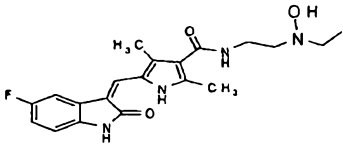
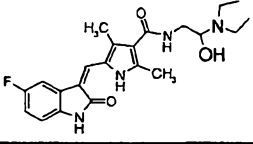
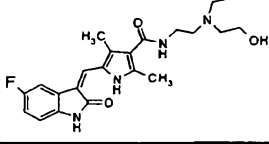
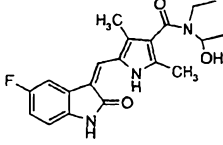
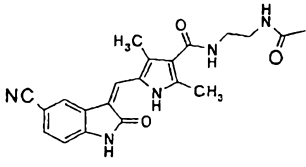
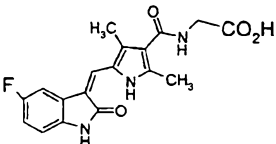
153		[2-(cianometil-amino)-etil]-amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-didro-indol- (3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico	362 [M+1]
154		[3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propil]-amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-didro-indol- (3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3- carboxílico	511 [M+1] 513 [M+1]
155		[3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propil]-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-didro-indol- (3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3- carboxílico	469 [M+1]
156		[3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-didro-indol- (3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3- carboxílico	453 [M+1]
157		[3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propil]-amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-didro-indol- (3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico	435 [M+1]
158		[3-(2-oxo-azepan-1-yl)-propil]-amida de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-didro-indol- (3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3- carboxílico	460 [M+1]
159		(2-acetilamino-etil)-amida de ácido 5-[5- bromo-2-oxo-1,2-didro-indol-(3Z)- ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3- carboxílico	443 [M+1] 445 [M+1]

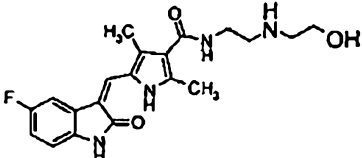
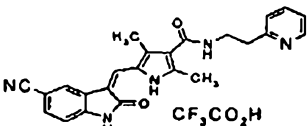
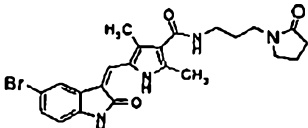
160		trifluoro-acetato de 4-[2-({5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-io	426 [M+1]
161		trifluoro-acetato de 4-[2-({2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-io	408 [M+1]
162		trifluoro-acetato de 4-[2-({5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-io	433 [M+1]
163		[2-(2-ciano-etilamino)-etil]-amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	454 [M-1] 456 [M-1]
164		[2-(2-ciano-etilamino)-etil]-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	410 [M-1]
165		[2-(2-ciano-etilamino)-etil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	394 [M-1]
166		[2-(2-ciano-etilamino)-etil]-amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico	376 [M-1]
167		[2-(2-ciano-etilamino)-etil]-amida de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	401 [M-1]
168		trifluoro-acetato de 4-[2-({5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-io	440 [M-1]

168		[2-(4-metilpiperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	424 [M-1]
169		[2-(4-metilpiperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	440 [M-1]
170		[2-(4-metilpiperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	484 [M-1] 486 [M-1]
171		[2-(4-metilpiperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico	406 [M-1]
172		[2-(3,5-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico	422 [M+1]
173		[2-(3,5-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	438 [M-1]
174		[2-(3,5-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	456 [M+1]
175		[2-(3,5-dimetil-piperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	498 [M-1] 500 [M-1]

176		[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]- amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2- oxo-1,2-didro-indol-(3Z)-ilideno- metil]-1H-pirrol-3-carboxílico	422 [M+1]
177		[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]- amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo- 1,2-didro-indol-(3Z)-ilideno-metil]- 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	438 [M-1]
178		[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]- amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo- 1,2-didro-indol-(3Z)-ilideno-metil]- 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	454 [M-1]
179		[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propil]- amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo- 1,2-didro-indol-(3Z)-ilideno-metil]- 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	498 [M-1] 500 [M-1]
180		[2-(4-benzil-piperazin-1-il)-etil]- amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2- oxo-1,2-didro-indol-(3Z)- ilidenometil]-1H-pirrol-3- carboxílico	482 [M-1]
181		[2-(4-benzil-piperazin-1-il)-etil]- amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo- 1,2-didro-indol-(3Z)-ilidenometil]- 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	500 [M-1]
182		[2-(4-benzil-piperazin-1-il)-etil]- amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo- 1,2-didro-indol-(3Z)-ilidenometil]- 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	517 [M-1]
183		[2-(4-benzil-piperazin-1-il)-etil]- amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo- 1,2-didro-indol-(3Z)-ilidenometil]- 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	560 [M-1] 562 [M-1]

184		(3-pirrolidin-1-il-2-ona)-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	480 [M+1]
185		trifluoroacetato de 4-[2-({5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}amino)-etil]-2-oxo-piperazin-1-ilo	440 [M-1]
186		(3-pirrolidin-1-il-2-ona)-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	
187		(3-pirrolidin-1-il-2-ona)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	
188		(3-pirrolidin-1-il-2-ona)-amida de ácido 5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	
189		(2-piridin-2-iletil)-amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	
190		sal (2-piridin-2-iletil)-amida trifluoroacetato de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	
191		sal (2-piridin-2-iletil)-amida hidrocloreto de ácido 5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	
192		sal (2-piridin-2-iletil)-amida trifluoroacetato de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico	

193		(2-etilaminoetil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
194		(2-aminoetil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
195		(2-dietil-N-oxoaminoetil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
196		(2-etil-N-hidroxi-aminoetil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
197		(2-dietilamino-2-hidroxietil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico
198		[2-etil-2-(2-hidroxietil)-aminoetil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
199		[2-etil-2-(1-hidroxietil)aminoetil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
200		(2-N-acetilaminoetil)-amida de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
201		(carboximetil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

202		[2-(2-hidroxetilamino)etil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico
203		(2-piridin-2-iletil)-amida trifluoroacetato de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico
204		(3-pirrolidin-1-il-2-onapropil)-amida trifluoroacetato de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico

Os números dos compostos correspondem aos números dos Exemplos na seção de Exemplos. Isto é, a síntese do Composto 1 na Tabela 1 está descrita no Exemplo 1. Os compostos apresentados na Tabela 1 são apenas exemplificativos e não se destinam a limitar de qualquer modo o âmbito desta invenção.

MODALIDADES PREFERIDAS

Embora a definição mais abrangente seja mencionada no Sumário da Invenção, alguns compostos de Fórmula (I) apresentados abaixo são preferidos.

- (1) Um grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^1 , R^3 e R^4 são hidrogênio.
- (2) Outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^1 , R^2 e R^4 são hidrogênio.
- (3) Outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^1 , R^2 e R^3 são hidrogênio.
- (4) Outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^2 , R^3 e R^4 são hidrogênio.
- (5) Outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são hidrogênio.
- (6) Ainda outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^5 , R^6 ou R^7 , de preferência R^5 ou

R^6 , mais preferivelmente R^6 é $-\text{COR}^{10}$ onde R^{10} é $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ onde:

R^{11} é hidrogênio ou alquila inferior substituída, de preferência hidrogênio ou metila;

5 n é 2, 3 ou 4, de preferência 2 ou 3 e alquila, mais preferivelmente alquila inferior

R^{12} é $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ onde R^{13} e R^{14} são independentemente substituída ou R^{13} e R^{14} combinam-se para formar um grupo selecionado a partir de $-(\text{CH}_2)_4-$,
 10 $-(\text{CH}_2)_5-$, $-(\text{CH}_2)_2\text{-O-}(\text{CH}_2)_2-$ ou $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2-$, preferivelmente R^{13} e R^{14} são independentemente hidrogênio, metila, etila, ou combinam-se para formar morfolin-4-ila, pirrolidin-1-ila, piperazin-1-ila ou 4-metilpiperazin-1-ila.

15 Mais preferivelmente, R^5 ou R^6 em (6) é N-(2-dimetilaminoetil)aminocarbonila, N-(2-etilaminoetil)-N-metilaminocarbonila, N-(3-dimetilaminopropil)aminocarbonila, N-(2-dietilaminoetil)aminocarbonila, N-(3-etilaminopropil)aminocarbonila, N-(3-dietilaminopropil)aminocarbonila, 3-pirrolidin-1-ilpropilaminocarbonila, 3-morfolin-4-ilpropilaminocarbonila, 2-pirrolidin-1-iletilaminocarbonila, 2-morfolin-4-il-etilaminocarbonila, 2-(4-metilpiperazin-1-il)etilaminocarbonila, 2-(4-metilpiperazin-1-il)propilaminocarbonila,
 20 2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etilaminocarbonila ou 2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)propilaminocarbonila, ainda mais preferivelmente N-(2-dietilaminoetil)aminocarbonila ou N-(2-etilaminoetil)aminocarbonila.

30 (7) Ainda outro grupo preferido de compostos de Fórmula

(I) é aquele em que R^5 , R^6 ou R^7 , de preferência R^5 ou R^6 , mais preferivelmente R^6 é $-\text{COR}^{10}$ onde R^{10} é $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ onde R^{13} é hidrogênio e R^{14} é alquila, de preferência alquila inferior substituída por hidroxil, arila, heteroarila, heteroalíclico ou carboxil, mais preferivelmente metila, arila, propila ou butila substituída por hidroxil, arila, heteroalíclico tal como piperidina, piperazina, morfolina e similares, heteroarila ou carboxil. Ainda mais preferivelmente dentro deste grupo (7), R^5 ou R^6 é 2-etoxicarbonilmetil-aminocarbonila, carboximetilaminocarbonila, 3-hidroxipropil-aminocarbonila, 2-hidroxietilaminocarbonila, 3-triazin-1-ilpropilaminocarbonila, triazin-1-iletaminocarbonila, 4-hidroxifeniletaminocarbonila, 3-imidazol-1-ilpropilaminocarbonila, piridin-4-ilmetilaminocarbonila, 2-piridin-2-iletaminocarbonila ou 2-imidazol-1-iletaminocarbonila.

(8) Ainda outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^5 , R^6 ou R^7 , de preferência R^5 ou R^6 , mais preferivelmente R^6 é $-\text{COR}^{10}$ onde R^{10} é $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ onde:

R^{11} é hidrogênio ou alquila, de preferência hidrogênio ou metila;

n é 2, 3 ou 4, de preferência 2 ou 3 e

R^{12} é $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ onde R^{13} e R^{14} se combinam para formar um heterociclo, de preferência um heterociclo de 5, 6 ou 7 elementos que contém um grupo de carbonila e 1 ou 2 átomos de hidrogênio. De preferência, R^5 ou R^6 é 2-(3-etoxicarbonilmetilpiperazin-1-il)etilaminocarbonila, 2-(3-oxopiperazin-1-il)etilaminocarbonila, 2-

(imidazolidin-1-il-2-ona)etilaminocarbonila, 2-(tetraidropirimidin-1-il-2-ona)etilaminocarbonila, 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-etilaminocarbonila, 3-(4-metilpiperazin-1-il)-propilaminocarbonila, 3-(3-etoxicarbonilmetilpiperazin-1-il)propilaminocarbonila, 3-(3-oxopiperazin-1-il)propilaminocarbonila, 3-(imidazolin-1-il-2-ona)propilaminocarbonila, 3-(tetraidropirimidin-1-il-2-ona)propilaminocarbonila, 3-(2-oxopirrolidin-1-il)propilaminocarbonila, 2-(2-oxoomopiperidin-1-il)etilaminocarbonila ou 3-(2-oxoomopiperidin-1-il)propilaminocarbonila.

(9) Ainda outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^5 , R^6 ou R^7 , de preferência R^5 ou R^6 , mais preferivelmente R^6 é $-COR^{10}$ onde:

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

R^{11} é hidrogênio ou alquila, de preferência hidrogênio ou metila;

n é 2, 3 ou 4, de preferência 2 ou 3 e

R^{12} é $-NR^{13}R^{14}$ onde R^{13} é hidrogênio e R^{14} é cianoalquila ou $-NHCOR^a$ onde R^a é alquila; ou

(b) R^{10} é $-NR^{13}R^{14}$ onde R^{13} e R^{14} se combinam para formar um heterociclo que não contém um grupo de carbonila dentro do anel. De preferência, R^5 ou R^6 é 2-(2-cianoetilamino)etilaminocarbonila, 2-(acetilamino)etilaminocarbonila, morfolinocarbonila, piperidin-1-il-carbonila, 2-cianometilaminoetilaminocarbonila ou piperidin-1-ilcarbonila.

(10) Outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^5 é $-COR^{10}$ onde R^{10} é $-NR^{13}R^{14}$ onde R^{13} é hidrogênio e R^{14} é alquila inferior substituída por

hidroxi, alquila inferior substituída por hidroxialquilamino, carboxi ou $-NR^{18}R^{19}$ onde R^{18} e R^{19} são independentemente hidrogênio ou alquila inferior não-substituída, mais preferivelmente R^5 é 2-
 5 [(dietilamino)-2-hidroxietyl]aminocarbonila, 2-(N-etil-N-2-hidroxietylamino)etilaminocarbonila, carboximetilaminocarbonila ou 2-(2-hidroxietylamino)-etilaminocarbonila.

(11) Outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é
 10 aquele em que R^6 é $-COR^{10}$ onde R^{10} é $-NR^{13}R^{14}$ onde R^{13} é hidrogênio e R^{14} é alquila inferior substituída por hidroxi, alquila inferior substituída por hidroxialquilamino, carboxi ou $-NR^{18}R^{19}$ onde R^{18} e R^{19} são independentemente hidrogênio ou alquila inferior
 15 não-substituída; mais preferivelmente R^6 é 2-[(dietilamino)-2-hidroxi]etilaminocarbonila, 2-(N-etil-N-2-hidroxietylamino)etilaminocarbonila, carboximetilaminocarbonila ou 2-(2-hidroxietylamino)-etilaminocarbonila.

(12) Ainda outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^5 é $-COR^{10}$ onde R^{10} é $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ onde R^{12} é $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$ ou $-N(OH)R^{13}$ onde R^{13} e R^{14} são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila
 25 inferior não-substituída, preferivelmente R^5 é 2-(N-hidroxi-N-etilamino)etilaminocarbonila ou 2-[$N^+(O^-)(C_2H_5)_2$]etilaminocarbonila.

(13) Ainda outro grupo preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que R^6 é $-COR^{10}$ onde R^{10} é $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ onde R^{12} é $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$ ou $-N(OH)R^{13}$ onde
 30

R^{13} e R^{14} são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila inferior não-substituída, preferivelmente R^6 é 2-(N-hidroxi-N-etilamino)etilaminocarbonila ou 2-[$N^+(O^-)$ (C₂H₅)₂]etilaminocarbonila.

(14) Nos grupos preferidos acima (6)-(13) quando R^5 for $-COR^{10}$, então um grupo mais preferido de compostos é aquele em que:

R^6 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila, de preferência hidrogênio, metila, etila, isopropila, terc-butila, isobutila ou n-butila, mais preferivelmente hidrogênio ou metila e

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, arila, heteroarila e $-C(O)R^{17}$ onde R^{17} é hidroxil, alquila ou arila, mais preferivelmente hidrogênio, metila, etila, isopropila, n-, iso ou terc-butila, fenila, benzoila, acetila ou carboxil, ainda mais preferivelmente metila, hidrogênio ou fenila.

(15) Nos grupos preferidos acima (6)-(13) quando R^5 for $-COR^{10}$, então outro grupo mais preferido de compostos é aquele em que R^6 e R^7 se combinam para formar $-(CH_2)_4-$.

(16) Nos grupos preferidos acima (6)-(13) quando R^6 for $-COR^{10}$, então um grupo mais preferido de compostos é aquele em que:

R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila, de preferência hidrogênio, metila, etila, isopropila, terc-butila, isobutila ou

n-butila, mais preferivelmente hidrogênio ou metila e

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, arila, heteroarila e $-C(O)R^{17}$ onde R^{17} é hidroxí, alquila ou arila, mais preferivelmente hidrogênio, metila, etila, isopropila, n-, iso ou terc-butila, fenila, benzoila, acetila ou carboxi, ainda mais preferivelmente metila, hidrogênio ou fenila.

(17) Dentro dos grupos preferidos e mais preferidos acima (6)-(16), um grupo ainda mais preferido de compostos é aquele em que:

R^1 é hidrogênio, alquila, $-C(O)NR^8R^9$, cicloalquila ou arila não-substituída, de preferência hidrogênio, fenila, 3,4-dimetoxifenilaminocarbonila, 4-metoxi-3-clorofenilaminocarbonila, ainda mais preferivelmente hidrogênio ou metila, mais preferivelmente hidrogênio;

R^2 é ciano, hidrogênio, halo, alcoxi inferior, arila ou $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ onde R^{13} é hidrogênio e R^{14} é hidrogênio, arila ou alquila, de preferência R^2 é hidrogênio, cloro, bromo, flúor, metoxi, etoxi, fenila, dimetilaminossulfonila, 3-clorofenilaminossulfonila, carboxi, metoxi, aminossulfonila, metilaminossulfonila, fenilaminossulfonila, piridin-3-il-aminossulfonila, dimetilaminossulfonila, isopropilaminossulfonila, mais preferivelmente hidrogênio, flúor ou bromo;

R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$,

-NR¹³C(O)R¹⁴, arila, de preferência arila
 opcionalmente substituída por um ou dois substitutos
 selecionados a partir do grupo que consiste em
 alquila inferior, halo ou alcoxi inferior, e
 5 heteroarila, de preferência heteroarila
 opcionalmente substituída por um ou dois substitutos
 selecionados a partir do grupo que consiste em
 alquila inferior, halo ou alcoxi inferior; de
 preferência hidrogênio, metoxi, carboxi, fenila,
 10 piridin-3-ila, 3,4-diclorofenila, 2-metoxi-5-
 isopropilfenila, 4-n-butilfenila, 3-isopropilofenil,
 mais preferivelmente hidrogênio ou fenila e

R⁴ é hidrogênio.

(18) Outro grupo mais preferido de compostos de Fórmula
 15 (I) é aquele em que:

R¹ é hidrogênio, alquila, -C(O)NR⁸R⁹,
 cicloalquila ou arila não-substituída, de
 preferência hidrogênio, 3,4-dimetoxifenilaminocar-
 bonila, 4-metoxi-3-clorofenilaminocarbonila, ainda
 20 mais preferivelmente hidrogênio ou metila, mais
 preferivelmente hidrogênio;

R² é ciano, hidrogênio, halo, alcoxi inferior,
 arila ou -S(O)₂NR¹³R¹⁴ onde R¹³ é hidrogênio e R¹⁴ é
 hidrogênio, arila ou alquila, de preferência R² é
 25 hidrogênio, cloro, bromo, flúor, metoxi, etoxi,
 fenila, dimetilaminossulfonila, 3-clorofenil-
 aminossulfonila, carboxi, metoxi, aminossulfonila,
 metilaminossulfonila, fenilaminossulfonila, piridin-
 3-il-aminossulfonila, dimetilaminossulfonila, iso-
 30 propilaminossulfonila, mais preferivelmente

hidrogênio, flúor ou bromo;

R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, arila, de preferência arila
 5 opcionalmente substituída por um ou dois substitutos selecionados a partir do grupo que consiste em alquila inferior, halo ou alcoxi inferior, e heteroarila, de preferência heteroarila
 10 opcionalmente substituída por um ou dois substitutos selecionados a partir do grupo que consiste em alquila inferior, halo ou alcoxi inferior; de preferência hidrogênio, metoxi, carboxi, fenila, piridin-3-ila, 3,4-diclorofenila, 2-metoxi-5-isopropilfenila, 4-n-butilfenila, 3-isopropilofenil,
 15 mais preferivelmente hidrogênio ou fenila e

R^4 é hidrogênio.

Dentro do grupo preferido acima (18) um grupo mais preferido de compostos é aquele em que:

R^5 é $-COR^{10}$ onde R^{10} é como definido no Sumário da
 20 Invenção, de preferência $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ ou $-NR^{13}R^{14}$ como definido no Sumário da Invenção.

R^6 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila, de preferência hidrogênio, metila, etila, isopropila, tec-butila, isobutila ou
 25 n-butila, mais preferivelmente hidrogênio ou metila e

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, arila, heteroarila e $-C(O)R^{17}$ onde R^{17} é hidroxí, alquila ou arila, mais preferivelmente hidrogênio, metila, etila,
 30 isopropila, n-, iso ou terc-butila, fenila, benzoila,

acetila ou carboxi, ainda mais preferivelmente metila, hidrogênio ou fenila.

No grupo preferido acima (18) outro grupo mais preferido de compostos é aquele em que:

5 R^6 é $-\text{COR}^{10}$ onde R^{10} é como definido no Sumário da Invenção, de preferência $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ ou $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ como definido no Sumário da Invenção.

10 R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila, de preferência hidrogênio, metila, etila, isopropila, tec-butila, isobutila ou n-butila, mais preferivelmente hidrogênio ou metila e

15 R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, arila, heteroarila e $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ onde R^{17} é hidroxil, alquila ou arila, mais preferivelmente hidrogênio, metila, etila, isopropila, n-, iso ou terc-butila, fenila, benzoila, acetila ou carboxi, ainda mais preferivelmente metila, hidrogênio ou fenila.

20 (19) Outro grupo mais preferido de compostos de Fórmula (I) é aquele em que:

R^1 e R^4 são hidrogênio;

R^2 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halo, alcoxi inferior, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$ e $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$;

25 R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alcoxi inferior, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$ e $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, arila e heteroarila;

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

30 R^6 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila inferior e

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior e $-C(O)R^{17}$.

É outra modalidade presentemente preferida desta invenção que, em um composto que tem uma estrutura como descrito em (15):

R^{10} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, alcoxi inferior e $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, onde

n é 2 ou 3;

R^{11} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila inferior e

R^{12} é selecionado a partir do grupo que consiste em arila e $-NR^{13}R^{14}$.

É ainda uma modalidade presentemente preferida desta invenção que, em um composto que tem uma estrutura como descrito nos dois parágrafos anteriores, R^{13} e R^{14} sejam independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior e, combinados, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ ou $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(20) Outra modalidade presentemente preferida desta invenção é um composto em que:

R^1 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior, $-(CH_2)_rR^{16}$ e $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, arila e $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior, alcoxi inferior, arila, heteroarila e $-C(O)R^{15}$;

R^4 é hidrogênio;

R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila inferior;

R^6 é $-C(O)R^{10}$;

5 R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior e arila;

R^{16} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí e $-C(O)R^{15}$ e

r é 2 ou 3.

10 Uma modalidade presentemente preferida desta invenção é um composto que tem uma estrutura como descrito no parágrafo imediatamente acima no qual R^3 é arila opcionalmente substituída por um ou mais grupos selecionados a partir do grupo que consiste em alquila inferior, alcoxi inferior e halo.

15 (21) Do mesmo modo, é uma modalidade presentemente preferida desta invenção um composto em que:

R^1 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior, $-(CH_2)_rR^{16}$ e $-C(O)NR^8R^9$;

20 R^2 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, arila e $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior, alcoxi inferior, arila, heteroarila e $-C(O)R^{15}$;

25 R^4 é hidrogênio;

R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila inferior;

R^6 é $-C(O)R^{10}$;

30 R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior e arila;

R^{16} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí e $-C(O)R^{15}$ e

r é 2 ou 3,

R^{10} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, alcoxi inferior, $-NR^{13}R^{14}$ e $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, onde n é 1, 2 ou 3, R^{11} é hidrogênio e R^{12} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, alcoxi inferior, $-C(O)R^{15}$, heteroarila e $-NR^{13}R^{14}$.

(22) Uma modalidade adicional presentemente preferida desta invenção é um composto que tem uma estrutura como descrito no parágrafo imediatamente acima no qual R^3 e R^{14} são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior, heteroarila e, combinados, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ ou $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(23) Outra modalidade presentemente preferida desta invenção é um composto em que:

R^1 é $-C(O)NR^8R^9$, onde R^8 é hidrogênio e R^9 é arila opcionalmente substituída por um ou mais grupos selecionados a partir do grupo que consiste em halo, hidroxí e alcoxi inferior;

R^2 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, arila e $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior, alcoxi inferior, arila, heteroarila e $-C(O)R^{15}$;

R^4 é hidrogênio;

R^5 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila inferior;

R^6 é $-C(O)R^{10}$;

R^7 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila inferior e arila;

R^{16} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí e $-C(O)R^{15}$ e

r é 2 ou 3.

(24) Ainda uma outra modalidade presentemente preferida desta invenção é um composto em que:

R^1 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio e alquila inferior;

R^2 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halo, alcoxi inferior, arila, $-C(O)R^{15}$ e $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halo, arila, heteroarila e $-C(O)R^{15}$;

R^4 é hidrogênio;

R^5 é $-C(O)R^{10}$ e

R^6 e R^7 combinam-se para formar um grupo de $-(CH_2)_4-$.

Em um composto que tem uma estrutura como descrita no parágrafo imediatamente acima, é uma modalidade presentemente preferida aquela em que R^{10} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxí, alcoxi, $-NR^{13}R^{14}$ e $-NH(CH_2)_nNR^{13}R^{14}$ onde n é 2 ou 3.

Uma modalidade presentemente preferida desta invenção é um composto que tem uma estrutura como descrito nos dois parágrafos imediatamente acima no qual R^{13} e R^{14} são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila

inferior e, combinados, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ ou $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)-$.

UTILIDADE

As PKs cuja atividade catalítica é regulada pelos
 5 compostos desta invenção incluem cinases de tirosina de
 proteína das quais existem dois tipos, cinases de tirosina
 de receptor (RTKs) e cinases de tirosina celular (CTKs) e
 cinases de serina-treonina (STKs). A transdução de sinais
 mediados por RTK é iniciada por interação extracelular com
 10 um fator de crescimento específico (ligante), seguido pela
 dimerização de receptor, estimulação transiente da
 atividade da cinase de tirosina de proteína intrínseca e
 fosforilação. Desse modo são criados locais de ligação para
 moléculas de transdução de sinais intracelulares que
 15 conduzem à formação de complexos com um espectro de
 moléculas de sinalização citoplásmicas que facilitam a
 resposta celular apropriada (por exemplo, divisão da
 célula, efeitos metabólicos sobre o microambiente
 extracelular, etc.). Vide, Neuron 9:303-391 de Schlessinger
 20 e Ullrich, 1992.

Demonstrou-se que os locais de fosforilação da
 tirosina nos receptores de fator de crescimento funcionam
 como locais de ligação de afinidade elevada para domínios
 SH2 (homologia src) de moléculas de sinalização. Cell
 25 69:413-423 de Fantel e outros, 1992, Mol. Cell. Biol.
 14:2777-2785, Songyang e outros, 1994, Cell 72:767-778 de
 Songyang e outros, 1993 e Science 252:668-678 de Koch e
 outros, 1991. Foram identificadas diversas proteínas de
 substrato intracelular que se associam às RTKs. As mesmas
 30 podem ser divididas em dois grupos principais: (1)

substratos que possuem um domínio catalítico e (2) substratos que não possuem tal domínio mas que servem de adaptadores e se associam com moléculas cataliticamente ativas. Cell 72:767-778 de Songyang e outros, 1993. A

5 especificidade das interações entre receptores e domínios SH2 de seus substratos é determinada pelos resíduos de aminoácido imediatamente adjacentes ao resíduo de tirosina fosforilada. As diferenças nas afinidades de ligação entre domínios SH2 e as seqüências de aminoácidos em torno dos

10 resíduos de fosfotirosina em receptores específicos são compatíveis com as diferenças observadas nos seus perfis de fosforilação de substrato. Cell 72:767-778 de Songyang e outros, 1993. Estas observações sugerem que a função de

15 e disponibilidade de ligante mas também pelo conjunto de percursos de transdução de sinais a jusante que são ativados por um receptor específico. Sendo assim, a fosforilação propicia uma etapa reguladora importante que determina a seletividade de percursos de sinalização

20 recrutados por receptores de fator de crescimento específicos, bem como por receptores de fator de diferenciação.

As STKs, sendo principalmente citosólicas, afetam a bioquímica interna da célula, freqüentemente como uma

25 resposta a jusante a um evento PTK. As STKs têm estado envolvidas no processo de sinalização que inicia a síntese do DNA e subsequente mitose conduzindo à proliferação das células.

Sendo assim, a transdução de sinais PK resulta, entre

30 outras respostas, na proliferação, diferenciação,

crescimento e metabolismo das células. A proliferação anormal de células pode resultar em um conjunto vasto de enfermidades e doenças, incluindo o desenvolvimento de neoplasia tal como carcinoma, sarcoma, glioblastoma e
5 hemangioma, enfermidades tais como leucemia, psoríase, artereoesclerose, artrite e retinopatia diabética e outras enfermidades relacionadas com angiogênese e/ou vasculogênese não controladas.

Não é necessário um entendimento preciso do mecanismo
10 através do qual os compostos desta invenção inibem as PKs a fim de pôr em prática a presente invenção. Contudo, embora não estando por este meio limitado a qualquer mecanismo ou teoria, acredita-se que os compostos interajam com os aminoácidos na região catalítica das PKs. As PKs possuem
15 tipicamente uma estrutura bilobulada em que ATP parece aglutinar-se na fenda entre os dois lóbulos em uma região em que os aminoácidos são conservados entre PKs. Acredita-se que os inibidores das PKs se aglutinem por interações não covalentes tais como pontes de hidrogênio, forças de
20 Van der Waals e interações iônicas na mesma região genérica onde o ATP mencionado anteriormente se aglutina às PKs. Mais especificamente, acredita-se que o componente 2-indolinona dos compostos desta invenção se aglutine no espaço genérico normalmente ocupado pelo anel de adenina de
25 ATP. A especificidade de uma molécula específica para uma PK específica pode surgir então como resultado das interações adicionais entre os diversos substitutos da 2-indolinona e nos domínios de aminoácidos específicos às PKs específicas. Sendo assim, substitutos de indolinona
30 diferentes podem contribuir para a aglutinação preferencial

a PKs específicas. A capacidade para selecionar compostos ativos em locais de aglutinação de ATP diferentes (ou outro nucleótido) torna os compostos desta invenção adequados para visar qualquer proteína com tal local. Os compostos
5 descritos aqui têm portanto utilidade em testes *in vitro* para tais proteínas além de exibirem efeitos terapêuticos *in vivo* através da interação com tais proteínas.

Além disso, os compostos da presente invenção propiciam uma abordagem terapêutica para o tratamento de
10 diversos tipos de tumores sólidos, incluindo carcinomas, sarcomas, incluindo o sarcoma de Kaposi, eritroblastoma, glioblastoma, meningioma, astrocitoma, melanoma e mioblastoma, porém não se limitam aos mesmos. O tratamento ou prevenção de cânceres de tumores não sólidos tais como
15 leucemia não são considerados por esta invenção. As indicações podem incluir cânceres no cérebro, cânceres de bexiga, cânceres de ovário, cânceres gástricos, cânceres do pâncreas, cânceres do cólon, cânceres do sangue, cânceres de pulmão, cânceres dos ossos, porém não se limitam aos
20 mesmos.

Outros exemplos, sem limitação, dos tipos de enfermidades relacionadas com atividade inadequada da PK que os compostos descritos aqui podem auxiliar a prevenir, tratar e estudar, são enfermidades por proliferação de
25 células, enfermidades fibróticas e enfermidades metabólicas.

As enfermidades por proliferação de células, que podem ser impedidas, tratadas ou adicionalmente estudadas pela presente invenção incluem câncer, enfermidades por

proliferação de vasos sangüíneos e enfermidades por proliferação de células mesangiais.

As enfermidades por proliferação de vasos sangüíneos referem-se a enfermidades relacionadas a vasculogênese anormal (formação de vasos sangüíneos) e angiogênese (proliferação de vasos sangüíneos). Embora a vasculogênese e a angiogênese desempenhem papéis importantes em diversos processos fisiológicos normais tais como desenvolvimento embriônico, formação do lúteo corporal, cicatrização de feridas e regeneração de órgãos, os mesmos também desempenham um papel essencial no desenvolvimento do câncer onde resultam na formação de novas capilaridades necessárias para manter um tumor vivo. Outros exemplos de enfermidades por proliferação de vasos sangüíneos incluem artrite, onde novos vasos sangüíneos capilares invadem a articulação e destroem a cartilagem e doenças oculares, como a retinopatia diabética, onde novos vasos capilares na retina invadem o hialino, sangram e provocam cegueira.

Foram identificados duas RTKs estruturalmente relacionadas para aglutinar VEGF com afinidade elevada: o receptor de tirosina 1 tipo fms (fit-1) (Oncogene, 5:519-524 de Shibuya e outros, 1990; Science, 255:989-991 de De Vries e outros, 1992) e o receptor KDR/FLK-1, também conhecido como VEGF-R2. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi descrito como um mitogene específico de célula endotelial com atividade promotora de crescimento de célula endotelial *in vitro*. Biochein. Biophys. Res. Comm., 161:851-858 de Ferrara e Henzel, 1989; J. Biol. Chem., 265:19461-19566 de Vaisman e outros, 1990. Informações apresentadas no pedido de patente U.S. Nos. de Série

08/193.829, 08/038.596 e 07/975.750, sugerem enfaticamente que o VEGF não é apenas responsável pela proliferação de células endoteliais, mas é também o regulador principal da angiogênese normal e patológica. Vide genericamente,
5 Current Biology, 3(10) 699-702 de Klagsburn e Soker, 1993; J. Biol. Chem., 267:26031-26037 de Houck e outros, 1992.

As vasculogênese e angiogênese normais desempenham papéis importantes em diversos processos fisiológicos tais como desenvolvimento embriônico, cicatrização de feridas,
10 regeneração de órgãos e processos reprodutivos na mulher tais como o desenvolvimento de folículos no lúteo corporal durante a ovulação e o desenvolvimento da placenta após a gravidez. J. Biological Chem., 267(16):10931-34 de Folkman e Shing, 1992. As vasculogênese e/ou angiogênese não
15 controladas têm sido associadas a doenças tais como diabetes, bem como a tumores sólidos malignos cujo desenvolvimento depende da vascularização. Current Biology. 3(10) 699-702 de Klagsburn e Soker, 1993; J. Natl. Cancer Inst., 82:4-6 de Folkman, 1991; New Engl. J. Med., 324:1-5
20 de Weidner e outros, 1991.

O papel presumível do VEGF na proliferação e migração das células endoteliais durante a angiogênese e vasculogênese indica um papel importante para o receptor KDR/FLK-1 nestes processos. Doenças como diabetes mellitus
25 (Folkman, 198, XIth Congress of Thrombosis and Haemostasis (Verstraeta, e outros, Eds.) pp. 583-596, Leuven University Press, Leuven) e artrite, bem como desenvolvimento de tumores malignos podem resultar da angiogênese descontrolada. Vide por exemplo, N. Engl. J. Med.,
30 285:1182-1186 de Folkman 1971. Os receptores aos quais o

VEGF se aglutina especificamente são um alvo terapêutico importante e forte para a normalização e regulação da vasculogênese e/ou angiogênese e de diversas doenças graves que envolvem o crescimento celular anormal provocado por tais processos. DN&P 7(6):334-339 de Plowman e outros, 1994. Mais especificamente, o papel altamente específico do receptor KDR/FLK-1 na neovascularização faz dele um alvo selecionado para abordagens terapêuticas do tratamento do câncer e de outras doenças que envolvam a formação descontrolada de vasos sanguíneos.

Sendo assim, a presente invenção propicia compostos capazes de normalizar e/ou regular a transdução de sinais de cinase de tirosina incluindo a transdução de sinais do receptor KDR/FLK-1 a fim de inibir ou promover a angiogênese e/ou vasculogênese, isto é, compostos que inibem, impedem ou interferem no sinal transduzido por KDR/FLK-1 quando ativado por ligands tais como VEGF. Embora se acredite que os compostos da presente invenção atuem sobre um receptor ou outro componente ao longo do percurso de transdução do sinal da cinase da tirosina, os mesmos podem atuar também diretamente sobre as células do tumor que resultam da angiogênese descontrolada.

Embora a nomenclatura das contrapartes do ser humano e murino do receptor "flk-I" genérico difira, a mesma é, em muitos aspectos, permutável. O receptor do murino, Flk-1, e a sua contraparte humana, KDR, compartilham uma homologia seqüencial de 93,4% dentro do domínio intracelular. Do mesmo modo, o FLK-1 do murino aglutina-se ao VEGF humano com a mesma afinidade que o VEGF do camundongo e, conseqüentemente, é ativado pelo ligante derivado de ambas

as espécies. Cell, 72:835-846 de Millauer e outros, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7533-7537 de Quinn e outros, 1993. O FLK-1 também se associa aos substratos RTK humano e subseqüentemente fosforila com tirosina os mesmos (por exemplo, PLC- γ ou p85) quando co-expressos em células (fibroblastos do rim embrional humano).

Modelos que dependem do receptor FLK-1 são por conseguinte aplicáveis diretamente para entendimento do receptor KBR. Por exemplo, a utilização do receptor FLK-1 do murino em métodos que identifiquem compostos que regulem o percurso de transdução de sinal do murino é diretamente aplicável à identificação de compostos que possam ser utilizados para regular o percurso de transdução de sinal humano, isto é, que regulem a atividade relacionada com o receptor KDR. Sendo assim, compostos químicos identificados como inibidores de KDR/FLK-1 *in vitro*, podem ser confirmados em modelos *in vivo* adequados. Tanto camundongos *in vivo* como modelos animais de ratos têm demonstrado ser de extrema valia para o exame do potencial clínico de agentes que atuam sobre o percurso de transdução de sinal induzido por KDR/FLK-1.

Sendo assim, a presente invenção propicia compostos que normalizam, regulam e/ou inibem a vasculogênese e/ou angiogênese afetando a atividade enzimática do receptor KDR/FLK-1 e interferindo no sinal transduzido por KDR/FLK-1. Sendo assim, a presente invenção propicia uma abordagem terapêutica para o tratamento de diversos tipos de tumores sólidos incluindo glioblastoma, melanoma e sarcoma de kaposi e carcinoma ovariano, pulmonar, mamário, prostático, pancreático, do cólon e epidermóide, porém não se limitam

aos mesmos. Além disso, dados sugerem a administração de compostos que inibam o percurso de transdução de sinal mediado por KDR/FLK-1 também pode ser utilizada no tratamento de hemangioma, restenose e retinopatia diabética.

Além disso, esta invenção refere-se à inibição de vasculogênese e angiogênese por outros percursos mediados por receptor, incluindo o percurso que compreende o receptor flt-1.

A transdução de sinal mediado por receptor de tirosina quinase é iniciada por interação extracelular com um fator de crescimento específico (ligante) seguido da dimerização de receptor, estimulação transiente da atividade da proteína de tirosina quinase intrínseca e autofosforilação. Desse modo são criados locais de ligação para moléculas de transdução de sinais intracelulares que conduzem à formação de complexos com um espectro de moléculas de sinalização citoplásmicas que facilitam a resposta celular apropriada (por exemplo, divisão da célula, efeitos metabólicos sobre o microambiente extracelular, etc.). Vide, Neuron 9:303-391 de Schlessinger e Ullrich, 1992.

A homologia próxima das regiões intracelulares de KDR/FLK-1 com a do receptor PDGF- β (50,3% de homologia) e/ou receptor flt-1 associado, indica a indução de percursos de transdução de sinal de sobreposição. Por exemplo, para o receptor PDGF- β , elementos da família src (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7696-7700, de Twamley e outros, 1993), fosfatidilinositol-3'-quinase (Mol. Cell. Biol., 12:981-990 de Hu e outros, 1992), fosfolipase C γ

(Mol. Cell. Biol., 4:49-51 de Kashishian e Cooper, 1993), proteína ativadora de ras-GTPase, (EMBO J., 11:1373-1382 de Kashishian e outros), PTP-ID/syp (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1090:6939-6943 de Kazlauskas e outros, 1993), Grb2
5 (Mol. Cell. Biol., 14:6715-6726 de Arvidsson e outros, 1994) e as moléculas adaptadoras Shc e Nck (Mol. Cell. Biol., 13:6889-6896 de Nishimura e outros, 1993), demonstraram aglutinar-se a regiões que envolvam diferentes locais de autofosforilação. Vide genericamente, Prog.
10 Growth Factor Res., 5:37-54 de Claesson-Welsh, 1994. Sendo assim é provável que os percursos de transdução de sinal ativados por KDR/FLK-1 incluam o percurso ras (Nature, 360:689-692 de Rozakis e outros, 1992), a PI-3'-quinase, os percursos mediados por src e mediados por plcy. Cada um
15 destes percursos pode desempenhar um papel importante no efeito angiogênico e/ou vasculogênico do KDR/FLK-1 em células endoteliais. Conseqüentemente, ainda um outro aspecto desta invenção refere-se à utilização dos compostos orgânicos descritos aqui para regular a angiogênese e
20 vasculogênese visto que tais processos são controlados por estes percursos.

Inversamente, enfermidades relacionadas com a retração, contração ou fechamento de vasos sangüíneos, por exemplo a restenose, estão também incluídas e podem ser
25 tratadas ou prevenidas pelos métodos desta invenção.

Enfermidades fibróticas referem-se à formação anormal de matrizes extracelulares. Exemplos de enfermidades fibróticas incluem a cirrose hepática e enfermidades por proliferação de células mesangiais. A cirrose hepática
30 caracteriza-se pelo aumento de componentes da matriz

extracelular resultando na formação de uma lesão hepática. Uma matriz extracelular aumentada que resulte em uma lesão hepática também pode ser provocada por uma infecção viral como a hepatite. Lipócitos parecem desempenhar um papel principal na cirrose hepática. Outras enfermidades fibróticas envolvidas incluem aterosclerose.

Enfermidades por proliferação de células mesangiais referem-se a enfermidades provocadas por proliferação anormal de células mesangiais. Enfermidades por proliferação mesangial incluem diversas doenças renais em seres humanos tais como glomerulonefrite, nefropatia diabética e nefrosclerose maligna além de enfermidades como síndromes de microangiopatias trombóticas, rejeição a transplante, e glomerulopatias. O RTK PDGFR tem sido envolvido na manutenção da proliferação de células mesangiais. Kidney International 43:47S-54S de Floege e outros, 1993.

Muitos cânceres são enfermidades por proliferação de células e, como mencionado anteriormente, as PKs associadas às enfermidades por proliferação de células. Sendo assim, não é surpreendente que as PKs tais como, por exemplo, elementos da família RTK, tenham sido associados ao desenvolvimento do câncer. Alguns destes receptores, tipo EGFR (Br. J. Câncer 63:227-233 de Tuzi e outros 1991, APMIF 100:713-719 de Torp e outros 1992) HER2/neu (Science 244:707-712 de Slamon e outros 1989) e PDGF-R (Oncogene 7:627-733 de Kumabe e outros 1992) são superexpressos em muitos tumores e/ou persistentemente ativados por laços de autocrina. Na realidade, nos cânceres mais comuns e graves estas superexpressões do receptor (J. Neural. Sci.,

111:119-133 de Akbasak e Suner-Akbasak e outros, 1992, Cancer Treatment Res. 61: 1:249-273 de Dickson e outros 1992, J. Clin. Invest. 90:1352-1360 de Korc e outros, 1992) e laços de autocrina (J. Cell. Biol., 118:1057-1070 de Lee
5 e Donoghue, 1992, supra de Korc e outros supra de Akbasa e Suner-Akbasak e outros têm sido demonstrados. Por exemplo, o EGFR tem sido associado a carcinoma de células escamosas, astrocitoma, glioblastoma, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão e câncer de bexiga. O HER2 tem sido
10 associado aos cânceres de mama, ovário, gástrico, pulmão, pâncreas e bexiga. O PDGFR tem sido associado aos glioblastoma e melanoma bem como ao câncer de pulmão, ovário e próstata. A RTK c-met tem também sido associada à formação de tumores malignos. Por exemplo, c-met tem sido
15 associada, entre outros cânceres, a carcinomas e linfomas coloretais, da tireóide, pancreáticos, gástricos e hepatocelulares. Além disso a c-met tem sido associada a leucemia. Supraexpressão do gene c-met também tem sido detectada em pacientes com mal de Hodgkin e mal de
20 Burkitts.

IGF-IR, além de ter implicações na sustentação nutricional e no diabetes tipo II, também tem sido associada a diversos tipos de cânceres. Por exemplo, IGF-I tem sido comprometido como um estimulador do crescimento de
25 autocrina para diversos tipos de tumor, por exemplo células do carcinoma do câncer da mama no ser humano (J. Clin. Invest. 84:1418-1423 de Arteaga e outros, 1989) e células de pequenos tumores de pulmão (Cancer Res., 50:2511-2517 de Macauley e outros 1990). Além disso, IGF-I, embora
30 integralmente envolvido no crescimento normal e na

diferenciação do sistema nervoso, também parece ser um estimulador de autocrina de gliomas humanos. Cancer Res. 53:2475-2478 de Sandberg-Norpbjst e outros, 1993. A importância de IGF-IR e seus ligantes na proliferação de células é ainda mais sustentada pelo fato de que muitos tipos de células em cultura (fibroblastos, células epiteliais, células de músculos lisos, linfócitos-T, células mielóides, condrócitos e osteoblastos (as células tronco da medula)) são estimuladas pelo IGF-I para que desenvolvam. Eukaryotic Gen Expression, 1:301-326 de Goldring e Goldring, 1991. Baserga e Coppola sugerem que EGF-IR desempenha o papel central no mecanismo de transformação e, como tal, poderia ser o alvo preferido para intervenções terapêuticas para um espectro amplo de malignidades em seres humanos. Cancer Res., 55:249-252 de Baserga, 1995, Cell. 79:927-930 de Baserga 1994, Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595 de Coppola e outros, 1994.

As STKs têm sido comprometidas em muitos tipos de câncer incluindo, notavelmente, câncer de mama (Int. J. Cancer, 54:571-577 de Cance e outros (1993)).

A associação entre atividade anormal de PK e enfermidade não se restringe ao câncer. Por exemplo, as RTKs têm sido associadas a doenças tais como psoríase, diabetes mellitus, endometriose, angiogênese, desenvolvimento de placas ateromatosas, mal de Alzheimer, restenose, mal de Hippel-Lindau, hiperploriferação epidérmica, doenças neurodegenerativas, degeneração macular relacionada com a idade e hemangiomas. Por exemplo, o EGFE tem sido indicado na cicatrização da córnea e de feridas da derme. Defeitos na Insulina-R e IGF-IR são indicados na

diabetes mellitus do tipo II. Uma correlação mais completa entre RTKs específicas e suas indicações terapêuticas é apresentada em DN&P 7:334-339 de Plownar e outros, 1994.

Como mencionado anteriormente, não só as RTKs mas as
5 CTKs incluindo src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr e yrk, porém não se limitando aos mesmos, (revisto por Bolen e outros 1992 FASEB JS., 6:3403-3409) estão envolvidas no percurso de transdução de sinal proliferativo e metabólico e portanto poder-se-ia esperar e foi
10 demonstrado estarem envolvidos em muitas doenças mediadas por PTK às quais a presente invenção se refere. Por exemplo, src (v-src) que sofreram mutação demonstraram ser uma oncoproteína (pp60^{v-src}) em galinhas. Além disso, o seu homólogo celular, o proto-oncogene pp60^{c-src} transmite
15 sinais oncogênicos de muitos receptores. A superexpressão de EGFR ou HER2/neu em tumores conduz à ativação constitutiva de pp60^{csrc}, que é característica de células malignas, porém ausente em células normais. Por outro lado, camundongos deficientes na expressão de c-src apresentam um
20 fenótipo osteopetrótico, indicando uma participação importante de c-src na função osteoclástica e um possível envolvimento em enfermidades correlatas.

Similarmente, Zap70 tem sido implicado na sinalização de células-T que podem estar relacionadas com doenças auto-
25 imunes.

As STKs têm sido associadas a inflamação, doença auto-imune, imunorespostas, e doenças por hiperproliferação tais como restenose, fibrose, psoríase, osteoartrite e artrite reumatóide.

As PKs têm sido implicadas na implantação de embrião. Sendo assim, os compostos desta invenção podem propiciar um método eficaz de impedir tal implantação de embrião e desse modo serem úteis como agentes do controle da natalidade.

5 Outras enfermidades que podem ser tratadas ou prevenidas utilizando os compostos desta invenção são enfermidades imunológicas tais como doença auto-imune, AIDS e doenças cardiovasculares tais como aterosclerose.

Por fim, suspeita-se atualmente que tanto as RTKs como
10 as CTKs estão envolvidas em enfermidades hiperimunes.

Exemplos do efeito de diversos compostos exemplificativos desta invenção sobre diversas PTKs são mostrados na Tabela 2 abaixo. Os compostos e os dados apresentados não devem ser interpretados de modo nenhum
15 como limitadores do âmbito desta invenção.

ADMINISTRAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊTICA

Um composto da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, pode ser administrado como tal a um paciente ou pode ser administrado em
20 composições farmacêuticas nas quais os materiais acima são misturados com carreadores ou excipientes adequados. Técnicas para formulação e administração de drogas podem ser encontradas em "Remington's Pharmacological Sciences" Nack Publishing Co., Easton, PA., última edição.

25 Como usado aqui, "administrar" ou "administração" refere-se a distribuição de um composto de Fórmula (I) ou de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou de uma composição farmacêutica que contenha um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo desta

invenção a um organismo com a finalidade de prevenir ou tratar uma doença associada a PK.

Meios de administração adequados podem inclui, sem limitação, administração oral, retal, transmucosal ou intestinal ou injeções intramusculares, subcutâneas, intramedulares, intratecais, intraventricular direta, intravenosa, intravetreal, intraperitoneal, intranasal ou intraocular. Os meios de administração preferidos são oral e parentérico.

Alternativamente, pode-se administrar o composto em um modo local em vez de sistêmico, por exemplo, através de injeção do composto diretamente em um tumor sólido, freqüentemente em uma formulação de liberação concentrada ou contínua.

Além disso, pode-se administrar a droga em um sistema de distribuição de droga alvo, por exemplo em um lipossoma revestido com anticorpo específico de tumor. Os lipossomas serão o alvo e serão recebidos seletivamente pelo tumor.

Composições farmacêuticas da presente invenção podem ser manufaturadas por processos bem conhecidos na técnica, por exemplo, por meio de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, fabricação de drágea, pulverização, emulsificação, encapsulação, aprisionamento ou liofilização.

As composições farmacêuticas para utilização de acordo com a presente invenção podem ser formuladas de modo convencional utilizando um ou mais carreadores fisiologicamente aceitáveis que compreendam excipientes e auxiliares que facilitem o processamento dos compostos ativos em preparações que possam ser utilizadas

farmaceuticamente. A formulação adequada depende da rota de administração escolhida.

Para injeção, os compostos da invenção podem ser formulados em soluções aquosas, de preferência em soluções tampão fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hanks, solução de Ringer ou solução tampão salina fisiológica. Para administração transmucosal, são utilizados na formulação penetrantes apropriados à barreira a ser penetrada. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica.

Para administração oral, os compostos podem ser formulados combinando os compostos ativos com carreadores farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica. Tais carreadores permitem que os compostos da invenção sejam formulados como comprimidos, pílulas, pastilhas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas fluidas, suspensões e similares para ingestão oral pelo paciente. As preparações farmacêuticas para uso oral podem ser feitas utilizando um excipiente sólido, triturando opcionalmente a mistura resultante e processando a mistura de grãos, após adicionar outros adjuvantes adequados se desejado, para obter núcleos de comprimidos ou drágeas. Excipientes adequados são, em particular, enchedores tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol, preparações de celulose tais como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz e amido de batata e outras substâncias tais como gelatina, adraganto, metilcelulose, hidroxipropilmetil-celulose, carboximetil-celulose de sódio e/ou polivinil-pirrolidona (PVP). Se desejado, podem ser adicionados agentes desintegradores,

tais como polivinil-pirrolidona encadeada, ágar ou ácido algínico. Também pode ser utilizado um sal tal como alginato de sódio.

Os núcleos de drágeas são munidos de revestimentos adequados. Para este fim, podem ser utilizadas soluções concentradas de açúcar que podem conter opcionalmente goma arábica, talco, polivinil-pirrolidona, carbopol gel, polietileno glicol e/ou dióxido de titânio, soluções de vernizes e solventes orgânicos adequados ou misturas de solventes. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos comprimidos ou revestimentos das drágeas para identificação ou para caracterizar diferentes composições de doses do composto ativo.

Composições farmacêuticas que podem ser utilizadas oralmente incluem cápsulas de pressão moderada feitas de gelatina, bem como cápsulas vedadas macias feitas de gelatina e um plastificador tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de pressão moderada podem conter os ingredientes ativos misturados com um enchedor tal como lactose, um aglutinante tal como amido e/ou um lubrificante tal como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizadores. Em cápsulas macias, os compostos ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos graxos, parafina líquida ou polietileno glicóis líquidos. Também podem ser misturados estabilizadores nestas formulações.

As composições farmacêuticas que também podem ser utilizadas incluem cápsulas de gelatina duras. Como exemplo não limitativo, a formulação do produto da droga oral da cápsula do composto ativo pode ter potências de dosagem de

50 e 200 mg (códigos de formulação J-011248-AA-00 e J-011248-AA-01, respectivamente). As duas potências de dosagem são feitas a partir dos mesmos grãos preenchendo cápsulas de gelatina dura de diferentes tamanhos, tamanho 3 para a cápsula de 50 mg e tamanho 0 para a cápsula de 200 mg. A composição da formulação pode ser, por exemplo, como indicado na Tabela 2.

TABELA 2

Ingrediente Nome/Tipo	Concentração em Granulação (% em peso)	Quantidade em Cápsula de 50 mg (mg)	Quantidade em Cápsula de 200 mg (mg)
Código da Formulação	J-011248-AA	J-011248-AA-00	J-011248-AA-01
Composto Ativo NF	65,0	50,0	200,0
Manitol NF	23,5	18,1	72,4
Croscarmelo se sódio NF	6,0	4,6	18,4
Povidona K 30 NF	5,0	3,8	15,2
Estearato de magnésio NF	0,5	0,38	1,52
Cápsula, amarelo Sueco NF		Tamanho 3	Tamanho 0

As cápsulas podem ser embaladas em recipientes de vidro marrom ou plástico para proteger o composto ativo da luz. Os recipientes que contêm a formulação da cápsula do

composto ativo devem ser armazenados a temperatura ambiente controlada (15-30°C).

Para administração por inalação, os compostos para uso de acordo com a presente invenção são convenientemente distribuídos na forma de um pulverizador de aerossol utilizando uma embalagem pressurizada ou um nebulizador e um propelente adequado, por exemplo, sem limitação, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano ou dióxido de carbono. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade da dosagem pode ser controlada através do fornecimento de uma válvula para administrar uma quantidade dosada. Cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina para uso em um inalador ou insuflador podem ser formulados com uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada tal como lactose ou amido.

Os compostos também podem ser formulados para administração parentérica, por exemplo, por injeção de bolo ou infusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de multidosagem, com um conservante adicionado. As composições podem ter formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos e podem conter substâncias de formulação tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

As composições farmacêuticas para administração parentérica incluem soluções aquosas de uma forma solúvel em água, tais como, sem limitação, um sal do composto ativo. Além disso, as suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas em um veículo lipofílico. Veículos

lipofílicos incluem óleos graxos tais como óleo de gergelim, ésteres de ácidos graxos sintéticos tais como etiloleato e triglicerídeos ou substâncias tais como lipossomas. As suspensões para injeções aquosas podem
5 conter substâncias que aumentem a viscosidade da suspensão, tais como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol ou dextrana. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores e/ou agentes adequados que aumentem a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de
10 soluções altamente concentradas.

Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água esterilizada isenta de piroxeno, antes de utilização.

15 Os compostos também podem ser formulados em composições retais tais como supositórios ou clisteres de retenção, utilizando, por exemplo, bases convencionais para supositórios tais como manteigas de cacau ou outros glicerídeos.

20 Além das formulações descritas anteriormente, os compostos também podem ser formulados como preparações concentradas. Tais formulações de atuação longa podem ser administradas mediante implantação (por exemplo, subcutânea ou intramuscularmente) ou por injeção intramuscular. Um
25 composto desta invenção pode ser formulado para esta rota de administração com substâncias poliméricas ou hidrofóbicas adequadas (por exemplo, em uma emulsão com um óleo farmaceuticamente aceitável), com resinas de troca iônica ou como um derivado levemente solúvel tal como, sem
30 limitação, um sal levemente solúvel.

Um exemplo não limitativo de um carreador farmacêutico para os compostos hidrofóbicos da invenção é um sistema co-solvente que compreende álcool benzílico, um agente tensoativo não-polar, um polímero orgânico miscível em água e uma fase aquosa tal como o sistema de co-solventes VPD. VPD é uma solução de 3% em peso/volume de álcool benzílico, 8% em peso/volume do agente tensoativo não-polar Polisorbate 80 e 65% em peso/volume de polietileno glicol 300, completando o volume com etanol absoluto. O sistema de co-solventes VPD (VPD:D5W) consiste em VPD diluído 1:1 com 5% de dextrose em solução aquosa. Este sistema de co-solventes dissolve bem compostos hidrofóbicos e produz baixa toxicidade após administração sistêmica. Naturalmente, as proporções de tal sistema de co-solventes podem variar consideravelmente sem destruir as suas características de solubilidade e toxicidade. Além disso, a identidade dos componentes de co-solventes pode variar: por exemplo, podem ser utilizados outros agentes tensoativos não-polares de baixa toxicidade em vez do Polisorbate 80, o tamanho da fração do polietileno glicol pode variar, outros polímeros biocompatíveis podem substituir o polietileno glicol, por exemplo, polivinil-pirrolidona e outros açúcares ou polissacarídeos podem substituir a dextrose.

Alternativamente, podem ser utilizados outros sistemas de distribuição para compostos farmacêuticos hidrofóbicos. Lipossomas e emulsões são exemplos bem conhecidos de veículos ou carreadores de distribuição para drogas hidrofóbicas. Além disso, também podem ser utilizados alguns solventes orgânicos tais como dimetilsulfóxido, embora muitas vezes a custo de maior toxicidade.

Além disso, os compostos podem ser distribuídos utilizando um sistema de liberação contínua, tal como matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham o agente terapêutico. Diversas substâncias de liberação contínua estão em vigência e são bem conhecidas daqueles versados na técnica. Cápsulas de liberação contínua, dependendo da sua natureza química, podem liberar os compostos durante algumas semanas até acima de 100 dias. Dependendo da natureza química e da estabilidade biológica do reagente terapêutico, podem ser utilizadas estratégias adicionais para estabilização da proteína.

As composições farmacêuticas aqui também podem compreender carreadores ou excipientes de fase sólida ou gel adequados. Exemplos de tais carreadores ou excipientes incluem carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, diversos açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina, e polímeros tais como polietileno glicóis, porém não se limitam aos mesmos.

Muitos dos compostos reguladores de PK da invenção podem ser propiciados como sais fisiologicamente aceitáveis em que o composto reivindicado pode formar as espécies carregadas negativa ou positivamente. Exemplos de sais em que o composto forma a porção positivamente carregada inclui, sem limitação, amônio quaternário (definido aqui em outra parte), sais tais como hidrocloreto, sulfato, carbonato, lactato, tartarato, malato, maleato, succinato em que o átomo de nitrogênio do grupo de amônio quaternário é um nitrogênio do composto selecionado desta invenção que reagiu com o ácido adequado. Sais em que um composto desta invenção forma a espécie carregada negativamente incluem,

sem limitação, os sais de sódio, potássio, cálcio e magnésio formados pela reação de um grupo de ácidos carboxílicos no composto com uma base apropriada (por exemplo, hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), etc.).

Composições farmacêuticas adequadas para utilização na presente invenção incluem composições em que os ingredientes ativos estão contidos em uma quantidade suficiente para atingir o objetivo pretendido, por exemplo, a regulação da atividade de PK ou tratamento ou prevenção de uma enfermidade associada a PK.

Mais especificamente, uma quantidade terapeuticamente eficaz significa uma quantidade de composto eficaz para prevenir, minorar ou melhorar sintomas da doença ou prolongar a sobrevida do indivíduo sendo tratado.

A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz é bem conhecida daqueles versados na técnica especialmente à luz da descrição detalhada fornecida aqui.

Para qualquer composto utilizado nos métodos da invenção, a quantidade ou dose terapeuticamente eficaz pode ser calculada inicialmente a partir de testes de cultura de células. Em seguida, a dosagem pode ser formulada para uso em modelos animais de modo a obter uma faixa de concentração de circulação que inclua o IC_{50} como determinado na cultura de células (isto é, a concentração do composto do teste que obtém uma inibição half-maximal da atividade do PK). Tais informações podem ser então utilizadas para determinar com maior exatidão dosagens adequadas em seres humanos.

A toxicidade e a eficácia terapêutica dos compostos descritos aqui podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, determinando o IC_{50} e o LD_{50} (ambos discutidos aqui em outra parte) para um composto em questão. Os dados obtidos a partir destes testes de cultura de células e estudos em animais podem ser utilizados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem pode variar dependendo da forma de dosagem utilizada e da rota de administração utilizada. A formulação exata, rota de administração e dosagem podem ser selecionadas pelo terapeuta levando em conta a condição do paciente. (Vide por exemplo, Fingle e outros, 1975, em "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p.1).

A quantidade e o intervalo da dosagem podem ser ajustados individualmente para fornecer níveis de plasma da espécie ativa que sejam suficientes para manter os efeitos reguladores da cinase. Estes níveis de plasma são denominados concentrações eficazes mínimas (MECs). A MEC variará para cada composto mas pode ser calculada a partir de dados *in vitro*, por exemplo, a concentração necessária para obter 50-90% de inibição de uma cinase pode ser calculada utilizando os testes descritos aqui. Dosagens necessárias para obter a MEC dependerão das características do indivíduo e da rota de administração. Podem ser utilizados testes ou biotestes HPLC para determinar concentrações de plasma.

Os intervalos de dosagem também podem ser determinados utilizando o valor MEC. Os compostos devem ser administrados utilizando um regime que mantenha os níveis

de plasma acima da MEC durante 10-90% do tempo, de preferência entre 30-90% e muito mais preferivelmente entre 50-90%.

Presentemente, as quantidades terapeuticamente
5 eficazes de compostos de Fórmula (I) podem variar entre aproximadamente 25 mg/m² e 1.500 mg/m² por dia; de preferência aproximadamente 3 mg/m²/dia. Ainda mais preferivelmente 50 mg/qm qd até 400 mg/qd.

Nos casos de administração local ou absorção seletiva,
10 a concentração local eficaz da droga pode não estar relacionada com a concentração de plasma e podem ser utilizados outros procedimentos conhecidos na técnica para determinar a quantidade e o intervalo de dosagem corretos.

Evidentemente, a quantidade de uma composição
15 administrada dependerá do indivíduo sendo tratado, da gravidade da enfermidade, do modo de administração, do critério do terapeuta que faz a prescrição, etc.

Se desejado, a composição pode ser apresentada em uma embalagem ou dispositivo de distribuição, tal como um
20 conjunto aprovado pela FDA, que pode conter uma ou mais formas de dosagem unitária com o ingrediente ativo. A embalagem pode, por exemplo, compreender uma folha de metal ou plástico tal como uma embalagem com bolhas. A embalagem ou dispositivo de distribuição pode vir acompanhado de
25 instruções para administração. A embalagem ou dispositivo de distribuição também pode vir acompanhado de uma informação associada ao recipiente em uma forma prescrita por uma agencia governamental que regula a fabricação, utilização ou venda de produtos farmacêuticos, nota essa
30 que reflete a aprovação pela agencia da forma das

composições ou da administração em seres humanos ou animais. Tal observação, por exemplo, pode ser uma etiqueta aprovada pela U.S. Food and Drug Administration para prescrição de drogas ou uma inserção aprovada no produto.

5 As composições que compreendam um composto da invenção formulado em um carreador farmacêutico compatível também podem ser preparadas, colocadas em um recipiente apropriado e etiquetadas para tratamento de uma enfermidade indicada. Condições adequadas indicadas na etiqueta podem incluir o
10 tratamento de um tumor, a inibição de angiogênese, o tratamento de fibrose, diabetes e similares.

É também um aspecto desta invenção o fato de que um composto descrito aqui ou seu sal ou pró-droga possam ser combinados com outros agentes quimioterápicos para o
15 tratamento das doenças e enfermidades discutidas acima. Por exemplo, um composto, sal ou pró-droga desta invenção poderiam ser combinados com agentes de alquilação tais como fluorouracil (5-FU) isoladamente ou combinado com leukovorin; ou outros agentes de alquilação tais como, sem
20 limitação, outros análogos de pirimidina tais como UFT, capecitabina, gemcitabina e citarabina, os sulfonatos de alquila, por exemplo, bussulfan (utilizado no tratamento da leucemia granulocítica crônica), improssulfan e pipossulfan; aziridinas, por exemplo, benzodepa,
25 carboquona, meturedpa e uredepa; etileno iminas e metil melaminas, por exemplo, altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamina, trietilenotiofosforamida e trimetilolmelamina e as mostardas de nitrogênio, por exemplo, clorambucila (utilizada no tratamento da leucemia
30 linfocítica crônica, macroglobulinemia primária e linfoma

non-Hodgkin), ciclofosfamida (utilizada no tratamento do mal de Hodgkin, mieloma múltiplo, neuroblastoma, câncer mamário, câncer ovariano, câncer pulmonar, tumor de Wilm e rabdomiossarcoma), extramustina, ifosfamida, novembriquina, prednimustina e mostarda de uracila (utilizadas no tratamento de trombocitose primária, linfoma non-Hodgkin, mal de Hodgkin e câncer ovariano) e triasinas, por exemplo, da carbazina (utilizada no tratamento de sarcoma de tecido mole).

Um composto, sal ou pró-droga desta invenção também podem ser utilizados em combinação com outros agentes quimioterápicos anti-metabólitos tais como, sem limitação, análogos de ácido fólico, por exemplo, metotrexato (utilizado no tratamento de leucemia linfocítica aguda, coriocarcinoma, câncer mamário por micose fungóide, câncer de cabeça e pescoço e sarcoma osteogênico) e pteropterina e os análogos de purina tais como mercaptopurina e tioguanina que têm aplicação no tratamento das leucemias granulocítica aguda, linfocítica aguda e granulocítica aguda.

Considera-se que um composto, sal ou pró-droga desta invenção também possam ser utilizados em combinação com agentes quimioterapêuticos com base em produtos naturais tais como, sem limitação, os vinca alcalóides, por exemplo, vinblastina (utilizada no tratamento de câncer mamário e testicular), vincristina e vindesina; as epipodofilotoxinas, por exemplo, etoposida e teniposida, ambas adequadas no tratamento do câncer testicular e do sarcoma de Kaposi; os agentes quimioterapêuticos antibióticos, por exemplo, dalnoribicina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina (utilizados para tratar câncer do

estômago, cervical, do cólon, da mama, da bexiga e do pâncreas), dactinomicina, temozolomida, plicamicina, bleomicina (utilizadas no tratamento do câncer da pele, esôfago e trato genitourinário) e os agentes
5 quimioterapêuticos enzimáticos tais como L-asparaginase.

Além dos mencionados acima, um composto, sal ou pró-
droga desta invenção também poderia ser utilizada em
combinação com os complexos de coordenação de platina
(cisplatina, etc.); uréias substituídas tal como
10 hidroxiuréia; derivados de metilidrasina, por exemplo,
procarbazona; supressores adrenocorticais, por exemplo,
mitotana, aminoglutetimida e hormônio e antagonistas de
hormônios tais como os adrenocorticosteróides (por exemplo,
prednisona), progestinas (por exemplo, hidroxipro-
15 gesteronacaproato); estrogênios (por exemplo,
diétilstilbestrol); anti-estrogênios tal como tamoxifeno;
androgênios, por exemplo testosteronapropionato e
inibidores de aromatase tais como anastrozola.

Por fim, também se considera que a combinação de um
20 composto desta invenção será eficaz em combinação com
mitoxantrona ou paclitaxel para tratamento de cânceres de
tumores sólidos ou leucemias tais como, sem limitação,
leucemia (não-linfocítica) mielógena aguda.

PROCEDIMENTO SINTÉTICO GENÉRICO

25 A metodologia genérica que se segue pode ser utilizada
para preparar os compostos desta invenção:

2-Oxindola (1 equiv.) apropriadamente substituída, o
aldeído (1,2 equiv.) apropriadamente substituído e uma base
(0,1 equiv.) são misturados em um solvente (1-2 mL/mmol 2-
30 oxindola) e a mistura é então aquecida durante

aproximadamente 2 a aproximadamente 12 horas. Após esfriamento, o precipitado que se forma é filtrado, lavado com etanol ou éter frios e seco a vácuo para proporcionar o produto sólido. Se não se formar um precipitado, a mistura
5 de reação é concentrada e o resíduo é triturado com diclorometano-éter, o sólido resultante é coletado por filtração e seco em seguida. O produto pode ser opcionalmente ainda mais purificado por cromatografia.

A base pode ser uma base orgânica ou inorgânica. Se
10 for utilizada uma base orgânica é de preferência uma base de nitrogênio. Exemplos de bases orgânicas de nitrogênio incluem diisopropilamina, trimetilamina, trietilamina, anilina, piridina, 1,8-diazabicyclo[5,4,1]undec-7-eno, pirrolidina e piperidina, porém não se limitam aos mesmos.

Exemplos de bases inorgânicas são, sem limitação,
15 amônia, hidróxidos de metal alcalino ou alcalino terroso, fosfatos, carbonatos, bicarbonatos, bissulfatos e amidas. Os metais alcalinos incluem lítio, sódio e potássio enquanto que os alcalino terrosos incluem cálcio, magnésio
20 e bário.

Em uma modalidade presentemente preferida desta invenção, quando o solvente é um solvente prótico, como água ou álcool, a base é um metal alcalino ou uma base inorgânica de alcalino terroso de preferência um metal
25 alcalino ou um hidróxido de alcalino terroso.

Ficará claro para aqueles versados na técnica, com base nos princípios genéricos conhecidos da síntese orgânica e nas descrições aqui que base seria mais apropriada para a reação contemplada.

O solvente no qual a reação é realizada pode ser um solvente prótico ou aprótico, de preferência é um solvente prótico. Um "solvente prótico" é um solvente que tem átomos de hidrogênio covalentemente aglutinados a átomos de oxigênio ou nitrogênio o que torna os átomos de hidrogênio consideravelmente ácidos e portanto capazes de serem "compartilhados" com um soluto através de uma ligação de hidrogênio. Exemplos de solventes próticos incluem, sem limitação, água e álcoois.

Um "solvente aprótico" pode ser polar ou apolar porém, em ambos os casos, não contém hidrogênios ácidos e portanto não é capaz de ligação de hidrogênio com solutos. Exemplos de solventes apróticos apolares, sem limitação, são pentano, hexano, benzeno, tolueno, cloreto de metileno e tetracloreto de carbono. Exemplos de solventes apróticos polares são clorofórmio, tetraidrofurano, dimetilssulfóxido e dimetilformamida.

Em uma modalidade presentemente preferida desta invenção, o solvente é um solvente prótico, de preferência água ou um álcool tal como etanol.

A reação é realizada a temperaturas superiores à temperatura ambiente. A temperatura é geralmente entre aproximadamente 30°C e aproximadamente 150°C, de preferência aproximadamente 80°C e aproximadamente 100°C muito mais preferivelmente aproximadamente 75°C e aproximadamente 85°C, que é aproximadamente o ponto de ebulição do etanol. Por "aproximadamente" pretende-se dizer que a faixa de temperatura é de preferência dentro de 10°C da temperatura indicada, mais preferivelmente dentro de 5°C da temperatura indicada e muito mais preferivelmente dentro

de 2°C da temperatura indicada. Sendo assim, por exemplo, por "aproximadamente 75°C" pretende-se dizer 75°C $\pm$ 10°C, de preferência 75°C $\pm$ 5°C e mais preferível 75°C $\pm$ 2°C.

2-Oxindolas e aldeídos podem ser facilmente sintetizados utilizando técnicas bem conhecidas na química. Aqueles versados na técnica devem entender que existem outros percursos sintéticos para formar os compostos da invenção e que o que se segue é propiciado como exemplo e não como limitação.

10 EXEMPLOS

As preparações e os exemplos que se seguem são propiciados para permitir que aqueles versados na técnica entendam com maior clareza e coloquem em prática a presente invenção. Os mesmos não devem ser considerados como limitadores do âmbito da invenção porém meramente ilustrativos e representativos da mesma.

Exemplos Sintéticos

Método A: Formilação de pirróis

POCl₃ (1,1 equiv.) é adicionado gota-a-gota a dimetilformamida (3 equiv.) a -10° C seguido pela adição do pirrol adequado dissolvido em dimetilformamida. Após agitação durante duas horas, a mistura de reação é diluída com H₂O e basificada para pH 11 com KOH 10N. O precipitado que se forma é coletado por filtração, lavado com H₂O e seco em um forno a vácuo para produzir o aldeído desejado.

Método B: Saponificação de ésteres de ácido pirrolcarboxílico

Uma mistura de éster de ácido pirrolcarboxílico e KOH (2-4 equiv.) em EtOH é refluído até que o término da reação é indicado por cromatografia de camada fina (TLC). A

mistura de reação esfriada é acidificada para pH 3 com HCl 1N. O precipitado que se forma é coletado por filtração, lavado com H₂O e seco em um forno a vácuo para produzir o ácido pirrolcarboxílico desejado.

5 Método C: Amidação

A uma solução agitada de um ácido pirrolcarboxílico dissolvido em dimetilformamida (0,3M) é adicionado 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (1,2 equiv.), 1-hidroxibenzo-triazol (1,2 equiv.) e trietilamina (2 equiv.). A amina adequada é adicionada (1 equiv.) e a reação agitada até que o término seja indicado por TLC. Acetato de etila é em seguida adicionado à mistura de reação e a solução lavada com NaHCO₃ saturado e salmoura (com sal extra), seca sobre MgSO₄ anidro e concentrada para produzir a amida desejada.

Método D: Condensação de aldeídos e oxindóis que contêm substitutos de ácido carboxílico

Uma mistura do oxindol (1 equivalente), 1 equivalente do aldeído e 1 - 3 equivalentes de piperidina (or pirrolidina) em etanol (0,4 M) é agitada a 90-100° C até que o término da reação seja indicado por TLC. A mistura é em seguida concentrada e o resíduo acidificado com HCl 2N. O precipitado que se forma é lavado com H₂O e EtOH e em seguida seco em um forno a vácuo para produzir o produto.

25 Método E: Condensação de aldeídos e oxindóis que não contêm substitutos de ácido carboxílico

Uma mistura do oxindol (1 equivalente), 1 equivalente do aldeído e 1 - 3 equivalentes de piperidina (or pirrolidina) em etanol (0,4 M) é agitada a 90-100° C até que o término da reação seja indicado por TLC. A mistura é

esfriada a temperatura ambiente e o sólido que se forma é coletado por filtração a vácuo, lavado com etanol e seco para produzir o produto. Se não se formar um precipitado após esfriamento da mistura de reação, a mistura é concentrada e purificada por cromatografia de coluna.

C. Exemplos de sínteses de oxindol

Os exemplos a seguir da síntese de oxindóis representativos não se destinam a limitar de modo algum o âmbito desta invenção. Rotas alternativas para os oxindóis mostrados assim como outros oxindóis a serem usados para produzir os compostos desta invenção tornar-se-ão evidentes para aqueles versados na técnica baseada nas descrições a seguir. Tais sínteses e oxindóis estão dentro do âmbito e espírito desta invenção.

15 5-Amino-2-oxindol

5-Nitro-2-oxindol (6,3 g) foi hidrogenado em metanol sobre paládio a 10% em carbono para produzir 3,0 g (60% de rendimento) do composto título como um sólido branco.

5-Bromo-2-oxindol

20 2-Oxindol (1,3 g) em 20 mL de acetonitrila foi esfriado até -10 °C e 2,0 g de N-bromossuccinimida foi lentamente adicionada com agitação. A reação foi agitada durante 1 hora a -10° C e 2 horas a 0° C. O precipitado foi coletado, lavado com água e seco para produzir 1,9 g (90% de rendimento) do composto título).

4-Metil-2-oxindol

Oxalato de dietila (30 mL) em 20 mL do éter seco foi adicionado com agitação a 19 g de etóxido de potássio suspenso em 50 mL de éter seco. A mistura foi esfriada em um banho de gelo e 20 mL de 3-nitro-oxileno em 20 mL de

éter seco foi adicionado lentamente. A mistura vermelha escura espessa foi aquecida com refluxo durante 0,5 hora, concentrada em um sólido vermelho escuro e tratada com hidróxido de sódio a 10% até que quase todo o sólido
5 dissolveu. A mistura vermelho escura foi tratada com peróxido de hidrogênio a 30% até que a cor vermelha mudou para amarelo. A mistura foi tratada alternadamente com hidróxido de sódio a 10% e peróxido de hidrogênio a 30% até que a cor vermelha escura desapareceu. O sólido foi
10 filtrado e o filtrado acidificado com ácido hidrocloreto 6N. O precipitado resultante foi coletado por filtração a vácuo, lavado com água e seco sob vácuo para produzir 9,8 g (45% de rendimento) de ácido 2-metil-6-nitrofenilacético como um sólido não-branco. O sólido foi hidrogenado em
15 metanol sobre paládio a 10% em carbono para produzir 9,04 g do composto título como um sólido branco.

7-Bromo-5-cloro-2-oxindol

5-Cloro-2-oxindol (16,8 g) e 19,6 g de N-bromossuccinimida foram suspensos em 140 mL de acetonitrila e
20 refluídas durante 3 horas. Cromatografia de camada fina (silica, etil acetato) a 2 horas de refluxo mostrou 5-cloro-2-oxindol or N-bromossuccinimida (R_f 0,8), produto (R_f 0,85) e um segundo produto (R_f 0,9) cujas proporções não mudam após outra hora de refluxo. A mistura foi esfriada
25 até 10 °C, o precipitado foi coletado por filtração a vácuo, lavado com 25 mL de etanol e seco por sucção durante 20 minutos no funil para produzir 14,1 g do produto úmido (56% de rendimento). O sólido foi suspenso em 200 mL de etanol desnaturado e lavado de lama por agitação e refluxo
30 durante 10 minutos. A mistura foi esfriada em um banho de

gelo até 10 ° C. O produto sólido foi coletado por filtração a vácuo, lavado com 25 mL de etanol e seco sob vácuo a 40° C para produzir 12,7 g (51% de rendimento) de 7-bromo-5-cloro-2-oxindol.

5 5-Fluoro-2-oxindol

5-Fluoroisatin (8,2 g) foi dissolvido em 50 mL of hidrato de hidrazina e refluído durante 1,0 hora. As misturas de reação foram em seguida vazadas em água gelada. O precipitado foi em seguida filtrado, lavado com água e
10 seco em um forno a vácuo para produzir o composto título.

5-Nitro-2-oxindol

2-Oxindol (6,5 g) foi dissolvido em 25 mL de ácido sulfúrico concentrado e a mistura mantida a -10 a -15 °C enquanto 2,1 mL de ácido nítrico vaporizado foi adicionado
15 gota-a-gota. Após a adição do ácido nítrico a mistura de reação foi agitada a 0 °C durante 0,5 hora e vazado em água gelada. O precipitado foi coletado por filtração, lavado com água e cristalizado a partir de ácido acético a 50%. O produto cristalizado foi em seguida filtrado, lavado com
20 água e seco sob vácuo para produzir 6,3 g (70%) de 5-nitro-2-oxindol.

5-Aminossulfonil-2-oxindol

A um frasco de 100 mL carregado com 27 mL de ácido clorossulfônico foi adicionado lentamente 13,3 g de 2-
25 oxindol. A temperatura da reação foi mantida abaixo de 30 °C durante a dição. Após a adição, a mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente durante 1,5 hora, aquecida a 68 °C durante 1 hora, esfriada e vazada em água. O precipitado foi lavado com água e seco em um forno a vácuo

para produzir 11,0 g de 5-clorossulfonil-2-oxindol (50% de rendimento) que foi usado sem purificação adicional.

5-Clorossulfonil-2-oxindol (2,1 g) foi adicionado a 10 mL hidróxido de amônia em 10 mL de etanol e agitado a
5 temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi concentrada e o sólido coletado por filtração a vácuo para produzir 0,4 g (20% de rendimento) do composto título como um sólido não-branco.

5-Isopropilaminossulfonil-2-oxindol

10 A um frasco de 100 mL carregado com 27 mL de ácido clorossulfônico foi adicionado lentamente 13,3 g de 2-oxindol. A temperatura da reação foi mantida abaixo de 30 °C durante a dição. A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente durante 1,5 hora, aquecida a 68 °C
15 durante 1 hora, esfriada e vazada em água. O precipitado que se formou foi filtrado, lavado com água e seco em um forno a vácuo para produzir 11,0 g (50%) de 5-clorossulfonil-2-oxindol (50% de rendimento) que foi usado sem purificação adicional.

20 Uma suspensão de 3 g de 5-clorossulfonil-2-oxindol, 1,15 g de isopropilamina e 1,2 mL de piridina em 50 mL de diclorometano foi agitada a temperatura ambiente durante 4 horas, tempo durante o qual se formou um sólido branco. O sólido foi coletado por filtração a vácuo, lavado para lama
25 com etanol quente, esfriado, coletado por filtração a vácuo e seco sob vácuo a 40° C durante a noite para produzir 1,5 g (45%) de 5-isopropilaminossulfonil-2-oxindol.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,69 (s, br, 1H, NH), 7,63 (dd, J = 2 e 8 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,32 (d, J

= 7 Hz, 1H, NH-SO₂-), 6,93 (d, J = 8 Hz, 1H), 3,57 (s, 2H), 3,14-3,23 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 0,94 (d, J = 7 Hz, 6H, 2xCH₃).

5-Fenilaminossulfonil-2-oxindol

Uma suspensão de 5-clorossulfonil-2-oxindol (1,62 g, 7 mmol), anilina (0,782 mL, 8,4 mmol) e piridina (1 mL) em diclorometano (20 mL) foi agitada a temperatura ambiente durante 4 horas. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (300 mL) e acidificada com ácido hidrocloreico 1N (16 mL). A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio e salmoura, seca e concentrada. O resíduo foi lavado com etanol (3 mL) e em seguida cromatografado em sílica gel purificando com metanol/diclorometano 1:9 para produzir 5-fenilaminossulfonil-2-oxindol.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,71 (s, br, 1H, NH), 10,10 (s, br, 1H, NH), 7,57-7,61 (m, 2H), 7,17-7,22 (m, 2H), 7,06-7,09 (m, 2H), 6,97-7,0 (m, 1H), 6,88 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 3,52 (s, 2H).

Piridin-3-ilamina de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico

Uma solução de 5-clorossufonil-2-oxindol (3 g) e 3-aminopiridina (1,46g) em piridina (15 mL) foi agitada a temperatura ambiente durante a noite, durante a qual se formou um sólido marrom. O sólido foi filtrado, lavado com etanol e seco sob vácuo para produzir 1,4 g (38%) de piridin-3-ilamina de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,74 (s, 1H, NH), 10,39 (s, 1H, SO₂NH), 8,27-8,28 (d, 1H), 8,21-8,23 (m, 1H), 7,59-

7,62 (m, 2H), 7,44-7,68 (m, 1H), 7,24-7,28 (m, 1H), 6,69-6,71 (d, 1H), 3,54 (s, 2H).

MS m/z (APCI+) 290,2.

5-Feniloxindol

5 5-Bromo-2-oxindol (5 g, 23,5 mmol) foi dissolvido em 110 mL de tolueno e 110 mL de etanol com agitação e um pouco de calor. Tetrakis(trifenilfosfina)paládio(0) (1,9 g, 1,6 mmol) foi adicionado seguido por 40 mL (80 mmol) de carbonato de sódio aquoso 2M. A esta mistura foi adicionado
10 ácido benzeno borônico (3,7 g, 30,6 mmol) e a mistura foi aquecida em um banho de óleo a 100° C durante 12 horas. A reação foi esfriada, diluída com acetato de etanol (500 mL), lavada com bicarbonato de sódio saturado (200 mL), água (200 mL), HCl 1N (200 mL) e salmoura (200 mL). A
15 camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio e concentrado para produzir um sólido marrom. Trituração com diclorometano produziu 3,8 g (77%) de 5-fenil-2-oxindol como um sólido bronzeado.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,4 (br s, 1H, NH), 7,57 (dd, J = 1,8 e 7,2 Hz, 1H), 7,5 to 7,35 (m, 5H), 7,29 (m, 1H), 6,89 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 3,51 (s, 2H, CH₂CO).

MS m/z 209 [M⁺].

De modo similar os seguintes oxindóis podem ser preparados:

25 6-(3,5-Diclorofenil)-1,3-diidroindol-2-ona

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,46 (br, 1H, NH), 7,64 (d, J = 1,8 Hz, 2H), 7,57 (m, 1H), 7,27 (m, 2H), 7,05 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 3,5 (s, 2H).

MS-EI m/z 277/279 [M]⁺.

30 6-(4-Butilfenil)-1,3-dihidroindol-2-ona

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,39 (s, 1H, NH), 7,49 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 8 Hz, 3H), 7,17 (dd, J = 1,5 e 7,8 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 3,48 (s, 2H, CH₂CO), 2,60 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1,57 (m, 2H, CH₂), 1,32 (m, 2H, CH₂), 0,9 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃).

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,29 (br s, 1H, NH), 7,16-7,21 (m, 2H), 7,08 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,97-7,01 (m, 2H), 6,89 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,47 (s, 2H, CH₂CO), 2,86 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,19 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 281 [M]⁺.

6-(4-Etilfenil)-1,3-diidroindol-2-ona

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,39 (br s, 1H, NH), 7,50 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,28 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,17 (dd, J = 1,6 & 7,5 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 3,48 (s, 2H, CH₂CO), 2,63 (q, J = 7,6 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1,20 (t, J = 7,6 Hz, 3H, CH₂CH₃).

MS-EI m/z 237 [M]⁺.

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,37 (br s, 1H, NH), 7,43 (m, 1H), 7,35-7,39 (m, 1H), 7,17-7,27 (m, 3H), 7,01 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 3,49 (s, 2H, CH₂CO), 2,95 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,24 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 251 [M]⁺.

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,28 (br s, 1H, NH), 7,17 (m, 2H), 6,93 (dd, J = 1,6 & 7,6 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 6,63 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,58 (dd, J = 2,4 & 8,5

Hz, 1H), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,45 (s, 2H, CH₂CO).

MS-EI m/z 269 [M]⁺.

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

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,51 (s, 1H, NH), 8,81 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 8,55 (dd, J = 1,8 e 5,7 Hz, 1H), 8 (m, 1H), 7,45 (dd, J = 5,7 and 9,3 Hz, 1H), 7,3 (m, 2H), 7,05 (s, 1H), 3,51 (s, 2H, CH₂CO).

MS m/z 210 [M]⁺.

10 (3-Cloro-4-etoxifenil)-amida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-4-carboxílico

A uma solução de 4-carboxi-2-oxindol (200 mg, 1,13 mmol) e 3-cloro-4-metoxifenilamina (178 mg, 1,13 mmol) em dimetilformamida (15 mL) a temperatura ambiente foi adicionado benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfônio hexafluorofosfato (reagente BOP, 997 mg, 2,26 mmol) seguido por 4-dimetilaminopiridina (206 mg, 1,69 mmol). A mistura foi agitada a temperatura ambiente durante 72 horas. A reação foi em seguida diluída com acetato de etanol (300 mL), lavada com bicarbonato de sódio saturado (100 mL), água, ácido hidrolórico 2N (100 mL), água (3x200 mL) e salmoura. Foi em seguida seca sobre sulfato de magnésio e concentrada. O resíduo foi triturado com acetato de etila para produzir (3-cloro-4-metoxifenil)-amida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-4-carboxílico como um sólido rosa.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,50 (s, br, 1H, NH), 10,12 (s, br, 1H, NH), 7,9 (s, J = 2,5 Hz, 1H), 7,62 (dd, J = 2,5 & 9 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,32 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 9 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,69 (s, 2H, CH₂).

MS-EI m/z 316 [M]⁺.

4-Carboxi-2-oxindol

Uma solução de trimetilsilildiazometano em hexano (2 M) foi adicionada gota-a-gota a uma solução de 2,01 g 2-cloro-3-carboxi-nitrobenzeno em 20 mL de metanol a temperatura ambiente até que não ocorresse qualquer evolução adicional de gás. Ácido acético foi em seguida adicionado para esfriar rapidamente o excesso de trimetilsilildiazometano. A mistura de reação foi evaporada sob vácuo e o resíduo foi seco em um forno durante a noite. O 2-cloro-3-metoxycarbonilnitrobenzeno obtido foi suficientemente puro para a reação a seguir.

Malonato dimetílico (6,0 mL) foi adicionado a uma suspensão gelada de 2,1 g de hidreto de sódio em 15 mL DMSO. A mistura de reação foi agitada a 100° C durante 1 hora e em seguida esfriada até temperatura ambiente. 2-cloro-3-metoxycarbonilnitrobenzeno (2,15 g) foi adicionado em uma porção e a mistura foi aquecida até 100° C durante 1,5 hora. A mistura de reação foi em seguida esfriada até temperatura ambiente, vazada em água gelada, acidificada para pH 5 e extraída com acetato de etila. A camada orgânica foi lavada com salmoura, seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada para produzir 3,0 g do dimetil 2-metoxycarbonil-6-nitrofenil-malonato.

Dimetil-2-metoxycarbonil-6-nitrofenilmalonato (3,0 g) foi refluxido em 50 mL de ácido hidrolórico 6N durante a noite. A mistura foi concentrada até secar, 20 mL de etanol e 1,1 g de cloreto de estanho(II) foram adicionados e a mistura foi refluxida durante duas horas. A mistura foi filtrada através de Celite, concentrada e cromatografada

sobre sílica gel usando acetato de etila:hexano:ácido acético como purificador para produzir 0,65 g (37%) de 4-carboxi-2-oxindol como um sólido branco.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 12,96 (s, br, 1H, COOH),
 5 10,74 (s, br, 1H, NH), 7,53 (d, J = 8Hz, 1H), 7,39 (t, J = 8Hz, 1H), 7,12 (d, J = 8Hz, 1H), 3,67 (s, 2H).

D. Síntese de 2-indolinonas de pirrol substituído.

Exemplo 1

Ácido 4-metil-5-(2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

Éster etílico de ácido 4-metil-2-pirrolcarboxílico (comercialmente disponível) foi formilado utilizando o método A para produzir (73%) de éster etílico de ácido 5-formil-4-metil-2-pirrolcarboxílico. Foi em seguida
 15 hidrolisado utilizando o método B para produzir ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (58%).

Oxindol (133 mg, 1 mmol) foi condensado com ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (153 mg) utilizando o método D para produzir 268 mg (100%) do composto título
 20 como um sólido vermelho alaranjado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,84 (s, br, 1H, NH),
 12,84 (s, br, 1H, COOH), 10,98 (s, br, 1H, NH), 7,82 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H, H-vinil), 7,18 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,01 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 7,5 Hz, 1H),
 25 6,71 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 2,32 (s, 3H, CH₃).

MS (modo negativo) 266,8 [M-1]⁺.

Exemplo 2

Ácido 4-metil-5-(1-metil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilideno-metil)-1H-pirrol-2-carboxílico

1-metil-1,3-diidroindol-2-ona (147 mg, 1 mmol) foi condensado com ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (153 mg) utilizando o método D para produzir 250 mg (86%) do composto título

5 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,82 (s, br, 1H, NH), 12,88 (s, br, 1H), 7,83 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,65 (s, 1H, H-vinil), 7,26 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,02-7,09 (m, 2H), 6,70 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 2,32 (s, 3H, CH_3).

MS m/z 283,0 $[\text{M}+1]^+$.

10 Exemplo 3

Éster metílico de ácido 4-metil-5-(2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

Oxindol (105 mg, 0,79 mmol) foi condensado com éster metílico de ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico 15 (110 mg, 0,67 mmol) utilizando o método E para produzir 153,2 mg (81%) do composto título.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,98 (s, br, 1H, NH), 10,97 (s, br, 1H, NH), 7,82 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H, H-vinil), 7,2 (dt, J = 1,2 e 7,7 Hz, 1H), 7,01 (dt, J = 20 1,2, 7,7 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,77 (d, J = 2 Hz, 1H).

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

Exemplo 4

25 Éster etílico de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

5-Cloro-1,3-diidroindol-2-ona (2,22 g, 13,2 mmol) foi condensado com éster etílico de ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (2,43 g) utilizando o método E para produzir 4,1 g (94%) do composto título como um sólido 30 laranja.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,95 (s, br, 1H, NH), 7,98 (d, J = 2,2 Hz, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-vinil), 7,18 (dd, J = 2,2 e 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 7,34 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-3'), 4,27 (q, J = 7,2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 1,29 (t, J = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

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

Exemplo 5

Ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

Uma mistura de éster etílico de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (1,3 g, 4 mmol) e hidróxido de potássio em metanol (25 mL) e etanol (25 mL) foi aquecida com refluxo durante a noite. Materiais insolúveis foram removidos por filtração e a mistura foi neutralizada com ácido hidrocloreto 6N para produzir 0,876 g (70%) do composto título.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,80 (s, br, 1H, NH), 12,90 (s, br, 1H, COOH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 8,02 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,81 (s, 1H, H-vinil), 7,20 (dd, J = 1,8 e 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,89 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 6,72 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-3'), 2,35 (s, 3H, CH₃).

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

Exemplo 6

(3-Pirrolidin-1-il-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (0,16 g, 0,76 mmol) foi condensado com (3-pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 5-

formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (0,2 g, preparado pelo método C) para produzir 60 mg (17%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH),
 5 11,02 (s, br, 1H, NH), 8,42 (t, J = 5,8 Hz, 1H, CONHCH₂),
 8,12 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-vinil), 7,30
 (dd, J = 1,8 e 8,4 Hz, 1H, H-6), 6,82 (d, J = 8,4 Hz, 1H,
 H-7), 6,77 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-3'), 3,22-3,31 (m, 2H,
 CH₂), 2,38-2,43 (m, 6H, 3xCH₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,62-1,71
 10 (m, 6H, 3xCH₂).

MS-EI m/z 456 e 458 [M⁺-1 e M⁺+2].

Exemplo 7

(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-
diidroindol-3-ilidenometil)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

15 5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (0,16 g, 0,75 mmol) foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-4-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (0,2 g, preparado pelo método C) para produzir 30 mg (8%) do composto título como um sólido laranja.

20 ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH),
 11,02 (s, br, 1H, NH), 8,40 (m, 1H, CONHCH₂), 8,12 (d, J =
 1,5 Hz, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-vinil), 7,30 (dd, J = 1,5
 e 8,2 Hz, 1H, H-6), 6,82 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-7), 6,78 (d,
 J = 2,4 Hz, 1H, H-3'), 3,23 (m, 2H, CH₂), 2,38-2,45 (m, 6H,
 25 CH₂ e N(CH₂CH₃)₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂), 0,93
 (t, J = 7,1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 458 e 460 [M⁺-1 e M⁺+2].

Exemplo 8

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-
 30 diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (212 mg, 1 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-1H-pirrol-2-carboxílico (preparado a partir de pirrol-2-carboxilato de etila pelo método A, B e em seguida C) para produzir 162 mg (38%) do composto título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,53 (s, br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 8,37 (t, 1H, CONHCH₂), 7,89 (m, 2H), 7,32 (dd, J = 2,0 Hz, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,80-6,84 (m, 2H), 3,3 (m, 2H, CH₂), 2,45-2,55 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ e CH₂), 0,95 (t, J = 7,2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

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

Exemplo 9

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

6-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (209 mg, 1mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-1H-pirrol-2-carboxílico para produzir 182 mg (42%) do composto título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,56 (s, br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 8,36 (t, 1H, CONHCH₂), 7,77 (s, 1H, H-vinil), 7,73 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,46 (m, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,96 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 3,31-3,32 (m, 2H, CH₂), 2,46-2,53 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ e CH₂), 0,96 (t, J = 6,9 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

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

Exemplo 10

(2-Dietilaminoetil)-metilamida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (212 mg, 1 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)metilamida de ácido 5-

formil-1H-pirrol-2-carboxílico para produzir 246 mg (55%) do composto título.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,54 (s, br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 7,90 (m, 2H), 7,33 (dd, J = 1,8 e 8,4 Hz, 1H), 6,82-6,85 (m, 3H), 3,55 (s, br, 2H, CH₂), 3,25 (s, br, 3H, NCH₃), 2,57 (t, J = 6,5 Hz, 2H, CH₂), 2,45 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0,91 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 444 e 446 [M⁺-1 e M⁺+1].

Exemplo 11

10 (2-Dietilaminoetil)metilamida de ácido 5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

6-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (209 mg, 1 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)metilamida de ácido 5-formil-1H-pirrol-2-carboxílico para produzir 277 mg (63%) do composto título.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,58 (s, br, 1H, NH), 11,04 (s, br, 1H, NH), 7,78 (s, 1H, H-vinil), 7,73 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,46 (m, 2H), 7,33-7,36 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,84 (m, 1H), 6,78 (m, 1H), 3,55 (s, br, 2H, CH₂), 3,25 (s, br, 3H, NCH₃), 2,58 (t, 2H, CH₂), 2,44 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0,92 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Exemplo 12

(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 3-metil-5-(2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

25 Oxindol (66,5 mg, 0,5 mmol) foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (preparado a partir de éster etílico de ácido 3-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico pelo método B e em seguida C) para produzir 39 mg (21%) do
30 composto título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,34 (s, br, 1H, NH), 10,88 (s, br, 1H, NH), 7,62-7,67 (m, 3H), 7,17 (m, 1H), 6,99 (m, 1H), 6,87 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,63 (d, J = 1 Hz, 1H), 3,26-3,32 (m, 2H, CH_2), 2,41-2,48 (m, 6H, CH_2 e
 5 $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2,29 (s, 3H, CH_3), 1,63 (m, 2H, CH_2), 0,93 (t, J = 7,2 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

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

Exemplo 13

(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-
 10 diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (106 mg, 0,5 mmol) foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico para produzir 35 mg (15%) do composto título.

15 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,35 (s, br, 1H, NH), 11,00 (s, br, 1H, NH), 7,89 (d, J = 1,9 Hz, 1H, H-4), 7,80 (s, 1H, H-vinil), 7,74 (t, J = 5,3 Hz, 1H, CONHCH_2), 7,31 (dd, J = 1,9 e 8,4 Hz, 1H, H-6), 6,83 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-7), 6,63 (s, 1H, H-3'), 3,26 (m, 2H, CH_2), 2,41-2,48 (m,
 20 6H, CH_2 e $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2,29 (s, 3H, CH_3), 1,63 (m, 2H, CH_2), 0,93 (t, J = 7,1 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

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

Exemplo 14

(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 3-metil-5-(2-oxo-6-
 25 fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-
carboxílico

6-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (105 mg, 0,5 mmol) foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico para produzir 67,8
 30 (30%) do composto título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,37 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,23-7,73 (m, 11H), 3,29 (m, 2H, CH_2), 2,41-2,48 (m, 6H, CH_2 e $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2,29 (s, 3H, CH_3), 1,64 (m, 2H, CH_2), 0,94 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

5 MS-EI m/z 456 $[\text{M}^+]$.

Exemplo 15

(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 5-(5-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

5-Metoxi-1,3-diidroindol-2-ona (82,5 mg, 0,5 mmol) foi
10 condensado com (3-dietilamino-propil)amida de ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico para produzir 80 mg (39%) do composto título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,45 (s, br, 1H, NH), 10,70 (s, br, 1H, NH), 7,68-7,70 (m, 2H), 7,32 (d, $J = 1,8$
15 Hz, 1H), 6,72-6,79 (m, 2H), 6,60 (s, 1H), 3,73 (s, 3H, OCH_3), 3,28 (m, 2H, CH_2), 2,41-2,48 (m, 6H, CH_2 e $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2,29 (s, 3H, CH_3), 1,63 (m, 2H, CH_2), 0,93 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 410 $[\text{M}^+]$.

20 Exemplo 16

(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 5-(6-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

6-Metoxi-1,3-diidroindol-2-ona (82.5 mg, 0.5 mmol) foi
condensado com (3-dietilamino-propil)amida de ácido 5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico para produzir 63 mg
25 (31%) do composto título.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (s, br, 1H, NH), 10,86 (s, br, 1H, NH), 7,39-7,63 e 6,37-6,55 (m, 6H), 3,73 (s, 3H, OCH_3), 3,3 (m, 2H, CH_2), 2,45 (m, 6H, CH_2 e

$N(CH_2CH_3)_2$, 2,28 (s, 3H, CH_3), 1,63 (m, 2H, CH_2), 0,93 (m, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

MS m/z 410 [M^+].

Exemplo 17

5 (2-Dietilamino-etil)amida de ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-car-boxílico

Éster etílico de ácido 4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico (May, Donald A.; Lash, Timothy D.; J. Org. Chem., 1992, 57:18, 4820-4828) foi formilado utilizando o método A e em seguida o B para produzir ácido 3-formil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico.

(5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (1,43 g, 6,8 mmol) foi condensado com 2-dietilaminoetil)amida de ácido 3-formil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico (1,97 g) para produzir 2,2 g (67%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,47 (s, 1H, NH), 11,0 (s, 1H, NH), 8,0 (d, 1H, NH), 7,70 (s, 1H, CH), 7,28 (dd, J = 2,1 e 8,2 Hz, 1H, ArH), 7,16 (m, 1H, ArH), 6,8 (d, J = 8,3 Hz, 1H, ArH), 3,3 (s, 2H, CONH), 2,5 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,78 (br m, 2H, pirrol CH₂), 2,72 (br m, 2H, pirrol CH₂), 1,7 (br m, 4H, $N(CH_2CH_3)_2$), 1,74 (br s, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2$), 0,96 (t, J = 7,4 Hz, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$).

25 MS-EI m/z 484 e 486 [M^+-1 e M^++1].

Exemplo 18

(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-car-boxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (20 mg, 0,1 mmol) foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 3-formil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico (30 mg) para produzir 33 mg (46%) do composto título como um sólido laranja.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10,9 (s, 1H, NH), 8,0 (m, 1H, NH), 7,68 (m, 1H, ArH), 7,4 (m, 1H, ArH), 7,29 (d, J = 1,9 e 8,5 Hz, 1H, ArH), 6,8 (d, J = 8 Hz, 1H, ArH), 2,7 (br m, 4H, 2 $\times$ NCH₂), 2,4 (m, 8H, 4 $\times$ NCH₂), 1,7 (br m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1,6 (br m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 499 e 501 [M^+ e $M^+ + 2$].

Exemplo 19

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 3-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (80 mg, 0,4 mmol) foi condensado com (3-pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 3-formil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico (120 mg) para produzir 43 mg (22%) do composto título como um sólido laranja bronzeado.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,4 (s, 1H, NH), 10,9 (s, 1H, NH), 8,0 (m, 1H, NH), 7,69 (m, 1H, ArH), 7,49 (m, 1H, ArH), 7,28 (d, J = 1,7 e 7,8 Hz, 1H, ArH), 6,8 (d, J = 8 Hz, 1H, ArH), 3,3 (br m, 2H, 2 $\times$ NCH₂), 2,8 (m, 4H, 2 $\times$ pirrolCH₂), 2,5 (br m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1,6 (br m, 8H, 2 $\times$ pirrolCH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂ e CONHCH₂).

MS-EI m/z 497 e 499 [M^+ e $M^+ + 2$].

Exemplo 20

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 3-(2-oxo-6-piridin-3-il-

1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

6-Piridin-3-il-1,3-diidroindol-2-ona (60 mg, 0,4 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 3-formil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico (80 mg) para produzir 50 mg (38%) do composto título como um sólido avermelhado.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,4 (s, 1H, NH), 11 (s, 1H, NH), 8,9 (d, 1H, NH), 8,7 (dd, 1H, ArH), 8,1 (dd, 1H, ArH), 7,9 (d, 1H, ArH), 7,6 (s, 1H, CH), 7,5 (dd, 1H, ArH), 7,3 (dd, 1H, ArH), 7,1 (m, 2H, ArH), 3,35 (m, 2H, CONHCH₂), 2,8 (m, 4H, 2xpirrolCH₂), 2,5 (br m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ e NCH₂), 1,75 (br s, 4H, 2xpirrolCH₂CH₂), 0,9 (t, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 484 [M⁺].

Exemplo 21

(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

A uma mistura de cloreto de benzoil (1 equiv.) e cloreto de alumínio (1 equiv.) em dicloroetano a 0° C foi adicionado 3,5-dimetil-2-pirrolcarboxilato de etila (1 equiv.). A mistura foi agitada a 80° C durante 4 horas. A mistura foi em seguida extraída com acetato de etila (EtOAc) e H₂O. Os extratos orgânicos combinados foram lavados com bicarbonato de sódio saturado e salmoura, secos e concentrados para produzir (51%) de ácido 4-benzoil-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-carboxílico.

Uma mistura de éster etílico de ácido 4-benzoil-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-carboxílico (4,13 g, 15,2 mmol) e nitrato de amônio cérico (33 g, 4 equiv.) em 50 mL de

tetraidrofurano (THF): ácido acético (HOAc):H₂O 1:1:1 foi refluído durante a noite. A mistura de reação foi em seguida esfriada, extraída com EtOAc e em seguida basificada para pH 9 com carbonato de cálcio. A camada orgânica foi em seguida lavada com salmoura, seca (MgSO₄) e concentrada, seguido por cromatografia de coluna para produzir 3,25 g (75%) de éster etílico de ácido 4-benzoil-5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico como um sólido amarelo.

5-Bromo-1,3-diidro-indol-2-ona foi condensado com 4-benzoil-5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico utilizando o método D para produzir ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico.

O ácido carboxílico acima foi em seguida acoplado com N,N-dietil-1,3-propanodiamina utilizando o método C para produzir o composto título.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 7,96 (m, 1H, CONHCH₂), 7,76 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 7,68 (t, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,40 (s, 2H) 7,33 (dd, J = 1,6 e 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,84 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,42-2,46 (m, 6H, 3xCH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,65 (m, 2H, CH₂), 0,94 (t, J = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂),

Impacto de Elétrons MS m/z 564 [M⁺+1].

Exemplo 22

(3-Morfolin-4-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,10 (s, 1H, NH), 11,14 (br s, 1H, NH), 7,92 (m, 1H, CONHCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,69

(t, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,33 (dd, J = 1,9 e 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,85 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,56 (m, 4H, 2xCH₂), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,35 (m, 6H, 3xCH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂).

5 **Exemplo 23**

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-3-metil-5-(2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,18 (s, 1H, NH), 11,14
10 (br s, 1H, NH), 8,01 (m, 1H, CONHCH₂), 7,74 (m, 1H), 7,67 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,32 (s, 1H, H-vinil), 7,17 (m, 1H), 6,92 (m, 1H), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,44 (m, 6 H, 3xCH₂), 2,11 (s, 3H, CH₃), 1,65-1,75 (m, 6H, 3xCH₂).

Impacto de Elétrons MS m/z 482 [M⁺].

15 **Exemplo 24**

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,01 (s, 1H, NH), 11,18
20 (br s, 1H, NH), 7,98 (m, 1H, CONHCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,68 (m, 1H), 7,55 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,33 (dd, J = 2,0 e 8,2 Hz, 1H, H-6), 6,84 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-7), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,42-2,47 (m, 6 H, 3xCH₂), 2,09 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,64 (m, 4H, 2xCH₂).

25 **Exemplo 25**

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-3-metil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,15 (s, 1H, NH), 11,16
30 (br s, 1H, NH), 7,98 (m, 1H, CONHCH₂), 7,77 (d, J = 7,7 Hz,

2H), 7,69 (m, 1H), 7,53-7,63 (m, 4H), 7,44 (m, 2H), 7,33-7,37 (m, 2H), 7,24 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,43-2,48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2,12 (s, 3H, CH₃), 1,74 (m, 2H, CH₂), 1,69 (m, 4H, 2xCH₂).

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

Exemplo 26

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(6-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pir-rol-2-carboxí-lico

10 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,99 (s, 1H, NH), 11,05 (br s, 1H, NH), 7,93 (m, 1H, CONHCH₂), 7,72 (m, 2H), 7,65 (m, 1H), 7,54 (m, 2H), 7,15 (s, 1H, H-vinil), 7,04 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-4), 6,51 (dd, J = 2,3 e 8,4 Hz, 1H, H-5), 6,44 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-7), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,35 (m, 2H, CH₂), 2,42-2,46 (m, 6 H, 3xCH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,72 (m, 2H, CH₂), 1,65 (m, 4H, 2xCH₂).

Impacto de Elétrons MS m/z 512 [M⁺].

Exemplo 27

20 (3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-metoxi-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pir-rol-2-carboxí-lico

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,24 (s, 1H, NH), 10,90 (br s, 1H, NH), 7,97 (m, 1H, CONHCH₂), 7,75 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,69 (m, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,24 (s, 1H, H-vinil), 6,79 (m, 2H), 6,66 (m, 1H), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,43-2,48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2,14 (s, 3H, CH₃), 1,71 (m, 2H, CH₂), 1,66 (m, 4H, 2xCH₂).

Impacto de Elétrons MS m/z 512 [M⁺].

Exemplo 28

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-benzoil-5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,20 (s, 1H, NH), 11,14 (br s, 1H, NH), 8,03 (m, 1H, CONHCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,68 (m, 1H), 7,55 (m, 2H), 7,38 (s, 1H, H-vinil), 7,08 (m, 1H), 7,01 (m, 1H), 6,87 (m, 1H), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,42-2,48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2,09 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,65 (m, 4H, 2xCH₂).

Impacto de Elétrons MS m/z 500 [M⁺].

Exemplo 29

(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidro-indol-2-ona foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 4-acetil-5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (preparado a partir de éster etílico de ácido 4-acetil-5-formil-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico pelo método B e em seguida C) para produzir o composto título.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,19 (s, 1H, NH), 11,19 (br s, 1H, NH), 8,15 (m, 1H, CONHCH₂), 8,11 (s, 1H, H-vinil), 7,72 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,38 (dd, J = 1,8 e 8,2 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-7), 3,27 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,46 (m, 9 H, CH₃ e 3xCH₂), 1,64 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J = 7,1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Exemplo 30

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,14 (m, 1H, CONHCH₂), 8,10 (s, 1H, H-vinil), 7,70 (d, 1H, H-4), 7,36 (dd, J = 1,6 e 8,1 Hz, 1H, H-6), 6,85 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-7), 3,32 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,35-2,48
5 (m, 6H, 3xCH₃), 1,65-1,71 (m, 6H, 3xCH₂).

MS m/z 499 e 501 [M⁺] e [M⁺+2].

Exemplo 31

(3-Morfolin-4-ilpropil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-
10 car-boxílico

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14,20 (s, 1H, NH), 11,26 (br s, 1H, NH), 8,09 (m, 2H, H-vinil e CONHCH₂), 7,73 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H-4), 7,38 (dd, J = 1,5 e 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,55 (m, 4H, 2xCH₂), 3,26
15 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,35 (m, 6H, 3xCH₃), 1,68 (m, 2H, CH₂).

MS-EI m/z 514 e 516 [M⁺-1] e [M⁺+1].

Exemplo 32

(3-Hidroxipropil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-
20 carboxí-lico

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14,17 (s, 1H, NH), 11,25 (br s, 1H, NH), 8,10 (s, 1H, H-vinil), 8,03 (m, 1H, CONHCH₂), 7,71 (br s, 1H, H-4), 7,37 (br d, J = 8,4 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-7), 4,51 (br s, 1H, OH),
25 3,51 (br s, 2H, CH₂), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂).

MS-EI m/z 445 e 447 [M⁺-1] e [M⁺+1].

Exemplo 34

30 (2-Morfolin-4-iletil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-

oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,19 (s, 1H, NH), 11,14 (br s, 1H, NH), 8,10 (s, 1H, H-vinil), 7,84 (m, 1H, CONHCH₂), 7,71 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,38 (dd, J = 1,8 e 8,2 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-7), 3,58 (m, 4H, 2xCH₂), 3,40 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,45 (m, CH₃ e CH₂).

MS-EI m/z 500 e 502 [M⁺-1] e [M⁺+1].

10 **Exemplo 35**

(2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,17 (s, 1H, NH), 11,23 (s, 1H, NH), 8,11 (s, 1H, H-vinil), 7,91 (m, 1H, CONHCH₂), 7,73 (d, J = 1,9 Hz, 1H, H-4), 7,39 (dd, J = 1,9 e 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,88 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,40 (m, 2H, CH₂), 2,62 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 1,69 (m, 4H, 2xCH₂).

20 **Exemplo 36**

[2-(4-Hidroxifenil)etil]amida de ácido 4-acetil-5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxílico

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,21 (s, 1H, NH), 11,18 (s, 1H, OH), 9,09 (s, 1H, NH), 8,06-8,10 (m, 2H), 7,73 (s, 1H), 7,38 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 6,88 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,67 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 3,42 (m, 2H, CH₂), 2,72 (m, 2H, CH₂), 2,56 (s, 3H, CH₃CO), 2,37 (s, 3H, CH₃).

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

Exemplo 37

(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-car-boxílico

Uma mistura de hidrocloreto de 2-aminoacetofenona (1 equiv.), isobutirilacetato de etila (1,2 equiv.) e acetato de sódio (2,4 equiv.) em H₂O foi agitada a 100° C durante 18 horas e em seguida esfriada até temperatura ambiente. A
10 camada aquosa foi decantada e o óleo foi dissolvido em acetato de etila. Foi em seguida lavada com água e salmoura e em seguida seca para produzir (93%) de éster etílico de ácido 2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico como um óleo marrom avermelhado.

15 ¹HNMNR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,21 (s, br, 1H, NH), 7,14-7,27 (m, 5H), 6,70 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 4,02 (q, J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,65 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,22 (d, J = 7,5 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,04 (t, J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

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

20 O pirrol acima foi formilado utilizando o método A para produzir (41%) éster etílico de ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico como um sólido avermelhado.

25 ¹HNMNR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,35 (s, br, 1H, NH), 9,14 (s, 1H, CHO), 7,36 (s, 5H), 3,96 (q, J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,74 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,29 (d, J = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 0,90 (t, J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

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

O éster de ácido pirrolcarboxílico foi hidrolisado
30 utilizando o método B para produzir (57%) de ácido 5-

formil-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico como um sólido bege.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,28 (s, br, 1H, COOH), 12,02 (s, br, 1H, NH), 9,10 (s, 1H, CHO), 7,35 (s, 5H),
5 3,81 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,28 (d, J = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 257 [M⁺].

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (120 mg, 0,31 mmol) foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
10 (preparado pelo método C) para produzir 120 mg (71%) do composto título.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,23 (s, br, 1H, NH), 11,08 (s, br, 1H, NH), 7,38-7,55 (m, 7H, Ar-H e CONHCH₂), 7,30 (s, 1H, H-vinil), 7,26 (dd, J = 1,8 e 7,8 Hz, 1H),
15 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 3,36 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,07 (m, 2H, CH₂), 2,34 (q, J = 7,1 Hz, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 2,22 (t, J = 6,9 Hz, 2H, CH₂), 1,40 (m, 2H, CH₂), 1,31 (d, J = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 0,86 (t, J = 7,1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 565.1 [M⁺+1].

20 Exemplo 38

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

Ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico
25 (127 mg, 0,28 mmol) foi condensado com 3-pirrolidin-1-ilpropilamina (43 mg, 0,336 mmol) para produzir 140 mg (66%) do composto título.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,40 (s, br, 1H, NH),
30 7,38-7,47 (m, 7H), 7,23-7,27 (m, 2H), 6,84 (d, J = 8,1 Hz,

1H), 3,36 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,08 (m, 2H, CH₂), 2,30 (m, 4H, 2xCH₂), 2,20 (t, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 1,62 (m, 4H, 2xCH₂), 1,42 (t, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 1,31 (d, J = 7,2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

5 MS-EI m/z 560 e 562 [M⁺ -1 e M⁺+1].

Exemplo 39

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

10 5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (57 g. 0,27 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (120 mg) para produzir 78 mg (53%) do composto título como um sólido amarelo.

15 ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,23 (s, br, 1H, NH), 11,09 (s, br, 1H, NH), 7,38-7,51 (m, 6H), 7,25-7,28 (m, 2H), 7,19 (t, 1H, CONHCH₂), 6,85 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,43 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,11 (m, 2H, CH₂), 2,28-2,39 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ e CH₂, 1,31 (d, J = 6,9 Hz, CH(CH₃)₂), 0,85 (t, J

20 = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 548 e 550 [M⁺ -1 e M⁺+1].

Exemplo 40

[3-(4-Metilpiperazin-1-il)propil]amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

25 5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (53 mg, 0,25 mmol) foi condensado com [3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]amida de ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (300 mg) para produzir 65 mg do composto título.

30 ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,22 (s, br, 1H, NH),

11,08 (s, br, 1H, NH), 7,23-7,50 (m, 9H), 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 3,37 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,05 (m, 2H, CH₂), 2,24 (m, 8H, 4xCH₂), 2,11 (m, 5H, CH₂ e CH₃), 1,42 (m, 2H, CH₂), 1,31 (d, J = 7,2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

5 MS-EI m/z 589 e 591 [M⁺ -1 e M⁺+1].

Exemplo 41

Ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (170 mg, 0,8 mmol) foi
10 condensado com ácido 5-formil-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (205 mg) utilizando o método D para produzir 210 mg (58%) do composto título como um sólido amarelo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,31 (s, br, 1H, NH),
15 11,16 (s, br, 1H, NH), 7,26-7,44 (m, 7H), 7,11 (s, 1H, H-vinil), 6,85 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,78 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,34 (d, J = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 452 [M⁺+1].

Exemplo 42

20 2-Pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (44 mg, 0,21 mmol) foi
condensado com (2-pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-
25 formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (70 mg, preparado do mesmo modo que a isopropila análoga acima) para produzir 0,03 g (27%) do composto título como um sólido amarelo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,87 (s, br, 1H, NH),
30 11,11 (s, br, 1H, NH), 7,36-7,51 (m, 6H), 7,26 (dd, J = 1,8

e 8,1 Hz, 1H), 7,2 (s, 1H, H-vinil), 7,09 (m, 1H, CONHCH₂), 6,83 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,17 (m, 2H, NCH₂), 2,48 (m, CH₃), 2,29-2,35 (m, 6H, 3xNCH₂), 1,59 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 518 e 520 [M⁺ -1 e M⁺+1].

5 Exemplo 43

(2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-[6-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(2-Metoxifenil)-1,3-diidroindol-2-ona (50 mg, 0,21 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (70 mg) para produzir 0,04 g (35%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,82 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,48 (m, 2H), 7,43 (m, 1H), 7,38 (m, 2H), 7,32 (m, 1H), 7,24 (m, 2H), 7,16 (s, 1H, H-vinil), 7,08 (m, 2H), 7,03 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,19 (m, 2H, NCH₂), 2,49 (m, CH₃), 2,32-2,38 (m, 6H, 3xNCH₂), 1,59 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 546 [M⁺].

Exemplo 44

(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (46 mg, 0,22 mmol) foi condensado com (2-dimetilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (65 mg) para produzir 60 mg (55%) do composto título como um sólido amarelo.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,86 (s, br, 1H, NH), 11,09 (s, br, 1H, NH), 7,47-7,49 (m, 2H), 7,38-7,41 (m, 4H), 7,26 (dd, J = 2,2 e 8,3 Hz, 1H), 7,21 (s, 1H, H-vinil), 7,04 (m, 1H, CONHCH₂), 6,77 (d, J = 8,3 Hz, 1H),
 5 3,15 (m, 2H, NCH₂), 2,48 (m, CH₃), 2,16 (t, J = 6,8 Hz, 2H, 3xNCH₂), 2,02 (s, 6H, 2xNCH₃).

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

Exemplo 45

(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 5-[6-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(2-Metoxifenil)-1,3-diidroindol-2-ona (53 mg, 0,22 mmol) foi condensado com (2-dimetilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (65 mg) para produzir 0,05 g (44%) do composto título como uma goma laranja.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,82 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,37-7,52 (m, 5H), 7,32 (m, 1H), 7,22-7,27 (m, 2H), 7,16 (s, 1H), 7,08 (m, 2H), 7,03 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,15 (m, 2H, NCH₂),
 20 2,49 (m, CH₃), 2,16 (t, J = 6,5 Hz, 2H, NCH₂), 2,02 (s, 6H, 2xNCH₃).

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

Exemplo 46

Éster etílico de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (60 mg, 0,29 mmol) foi condensado com éster etílico de ácido 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (75 mg) para produzir 78 mg (60%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,01 (s, br, 1H, NH), 11,13 (s, br, 1H, NH), 7,42-7,46 (m, 3H), 7,27-7,34 (m, 4H), 7,12 (s, 1H), 6,84 (dd, J = 2,2 e 8,3 Hz, 1H), 3,99-4,03 (m, 2H, OCH₂CH₃), 2,61 (s, 3H, CH₃), 0,98-1,03 (m, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 450 e 452 [M⁺ -1 e M⁺+1].

Exemplo 47

(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (0,47 g, 2,2 mmol) foi condensado com 5-formil-2-metil-4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,75 g) para produzir 0,11 g (42%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,86 (s, br, 1H, NH), 7,42-7,46 (m, 3H), 7,37-7,50 (m, 7H), 7,24-7,28 (m, 2H), 6,83 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,09 (m, 2H, NCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,38 (q, J = 7,1 Hz, 4H, 2xNCH₂CH₃), 2,26 (t, J = 6,9 Hz, 2H, NCH₂), 1,42 (m, 2H, NCH₂), 0,87 (t, J = 7,1 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI m/z 535.0 e 537 [M⁺ e M⁺+2].

Exemplo 48

(2-Dimetilamino-etil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Uma mistura de 3-oxobutirato de terc-butila e nitrito de sódio (1 equiv.) em ácido acético foi agitada a temperatura ambiente para produzir terc-butil-2-hidroximino-3-oxobutirato.

Etil-3-oxobutirato (1 equiv.), pó de zinco (3,8 equiv.) e o terc-butil-2-hidroximino-3-oxobutirato cru em ácido acético foi agitado a 60° C durante 1 hora. A mistura de reação foi vazada em H₂O e o filtrado foi coletado para
 5 produzir (65%) 2-terc-butiloxicarbonil-3,5-dimetil-4-etoxicarbonilpirrol.

Uma mistura de 2-terc-butiloxicarbonil-3,5-dimetil-4-etoxicarbonilpirrol e ortoformato de trietila (1,5 equiv.) em ácido trifluoroacético foi agitada a 15°C durante 1
 10 hora. A reação foi concentrada e o resíduo foi purificado para produzir (64%) 2,4-dimetil-3-etoxicarbonil-5-formilpirrol como agulhas amarelas.

2,4-Dimetil-3-etoxicarbonil-5-formilpirrol foi hidrolisado utilizando o método B para produzir (90%) ácido
 15 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 12 (br s, 2H, NH e CO₂H), 9,58 (s, 1H, CHO), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃).

MS m/z 267 [M⁺].

20 5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (0,17 g, 0,8 mmol) foi condensado com (2-dimetilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,2 g, preparado pelo método C) utilizando o método B para produzir 0,3 g (83%) do composto título como um sólido amarelo.

25 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, br, 1H, NH), 10,94 (s, br, 1H, NH), 8,07 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,75 (s, 1H, H-vinil), 7,44 (t, J = 5,2 Hz, 1H, CONHCH₂), 7,24 (dd, J = 1,8 e 8,4 Hz, 1H, H-6), 6,82 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-7), 3,26-3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s,

3H, CH₃), 2,38 (t, J = 6,7 Hz, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI m/z 430 e 432 [M⁺-1 e M⁺+1].

Exemplo 49

5 (2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

6-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (0,17 g, 0,8 mmol) foi condensado com 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
10 (0,2 g) para produzir 0,13 g (36%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,59 (s, br, 1H, NH), 10,93 (, br, 1H, NH), 7,85 (d, J = 7,92 Hz, 1H, H-4), 7,63-7,65 (m, 3H), 7,40-7,47 (m, 3H), 7,32-7,36 (m, 1H, Ar-H),
15 7,30 (dd, J = 1,6 e 7,9 Hz, 1H, H-5), 7,11 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-7), 3,28-3,34 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J = 6,8 Hz, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI m/z 428 [M⁺].

20 Exemplo 50

(2-Dimetilamino-etil)amida de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Cloro-1,3-diidroindol-2-ona (0,1 g, 0,6 mmol) foi
25 condensado com (2-dimetilamino-etil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,15 g) para produzir 0,22 g (90%) do composto título como um sólido amarelo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH),
30 10,98 (, br, 1H, NH), 7,96 (d, J = 2,0 Hz, 1H, H-4), 7,75

(s, 1H, H-vinil), 7,50 (t, J = 5,5 Hz, 1H, CONHCH₂), 7,12 (dd, J = 2,0 e 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,86 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,26-3,31 (m, 2H, NCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 2,36 (t, J = 6,6 Hz, 2H, NCH₂), 2,17 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI m/z 386 [M⁺].

Exemplo 51

(2-Dietilamino-etil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (0,17 g, 0,8 mmol) foi condensado com (2-dietilamino-etil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,2 g) para produzir 0,09 g (26%) do composto título como um sólido amarelo.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 10,98 (, br, 1H, NH), 8,09 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-4), 7,76 (s, 1H, H-vinil), 7,42 (t, J = 5,5 Hz, 1H, CONHCH₂), 7,24 (dd, J = 1,7 e 8,0 Hz, 1H, H-6), 6,82 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-7), 3,23-3,32 (m, 2H, NCH₂), 2,46-2,55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃), 0,96 (t, J = 7,2 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI m/z 458 e 460 [M⁺-1 e M⁺+1].

Exemplo 52

(2-Pirrolidin-1-il-etil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (0,09 g, 0,4 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletal)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,1 g) para

produzir 0,14 g (81%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 10,98 (, br, 1H, NH), 8,09 (d, J = 1,9 Hz, 1H, H-4), 7,76 (s, 1H, H-vinil), 7,53 (t, J = 5,5 Hz, 1H, CONHCH₂), 7,24 (dd, J = 1,9 e 8,5 Hz, 1H, H-6), 6,81 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-7), 3,29-3,35 (m, 2H, NCH₂), 2,54 (t, J = 6,9 Hz, 2H, NCH₂), 2,47 (m, sob DMSO), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,66-1,69 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 456 e 458 [M⁺-1 e M⁺+1].

Exemplo 53

(3-Imidazol-1-il-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (0,09 g, 0,4 mmol) foi condensado com (3-imidazol-1-il-propil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,1 g) para produzir 0,1 g (59%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,63 (s, br, 1H, NH), 10,99 (, br, 1H, NH), 8,09 (d, J = 2,2 Hz, 1H, H-4), 7,77 (s, 1H, H-vinil), 7,71 (t, J = 5,7 Hz, 1H, CONHCH₂), 7,65 (s, 1H, Ar-H), 7,25 (dd, J = 2,2 e 8,4 Hz, 1H, H-6), 7,20 (s, 1H, Ar-H), 6,89 (s, 1H, Ar-H), 6,81 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-7), 4,02 (t, J = 6,7 Hz, 2H, NCH₂), 3,18 (q, J = 6,7 Hz, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 1,93 (m, 2H, CH₂).

MS-EI m/z 467 e 469 [M⁺-1 e M⁺+1].

Exemplo 54

(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 5-[6-(2-metoxifenil)-2-

oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(2-Metoxifenil)-1,3-diidroindol-2-ona (30 mg, 0,13 mmol) foi condensado com (2-dimetilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (30 mg) para produzir 0,06 g (100%) do composto título como uma goma laranja amarelada.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, br, 1H, NH), 10,89 (s, br, 1H, NH), 7,79 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,63 (s, 1H, H-vinil), 7,46 (t, J = 5,5 Hz, 1H, CONHCH₂), 7,28-7,35 (m, 2H), 6,99-7,11 (m, 4H), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 3,27-3,31 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,39 (s, 3H, CH₃), 2,37 (m, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI m/z 458 [M⁺].

Exemplo 55

(2-Dimetilaminoetil)amida de ácido 5-[6-(3-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(3-Metoxifenil)-1,3-diidroindol-2-ona (30 mg, 0,13 mmol) foi condensado com (2-dimetilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (30 mg) para produzir 8 mg (14%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,59 (s, br, 1H, NH), 10,92 (s, br, 1H, NH), 7,84 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,65 (s, 1H, H-vinil), 7,42 (m, 1H, CONHCH₂), 7,36 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,29 (dd, J = 1,6 e 7,6 Hz, 1H), 7,20 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 7,11 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 6,91 (dd, J = 2,8 e 7,8 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,21-3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃),

2,36-2,40 (m, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI m/z 458 [M⁺].

Exemplo 56

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (80 mg, 0,4 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,1 g) utilizando o método B para produzir 79 mg (46%) do composto título.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,66 (s, br, 1H, NH), 10,95 (, br, 1H, NH), 8,15 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,81 (s, 1H, H-vinil), 7,71 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,40-7,47 (m, 4H), 7,31 (m, 1H), 6,95 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,2-3,31 (m, 2H, NCH₂), 2,46-2,55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,44 (s, 6H, 2xCH₃), 0,96 (t, J = 7,4 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI m/z 456 [M⁺].

Exemplo 57

(2-Pirrolidin-1-iletetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (0,04 g, 0,2 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,04 g) para produzir o composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,65 (s, br, 1H, NH), 10,96 (, br, 1H, NH), 8,15 (d, J = 1,0 Hz, 1H), 7,80 (s, 1H, H-vinil), 7,71 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,49 (t, J = 6,3 Hz, 1H, CONHCH₂), 7,41-7,46 (m, 3H), 7,31 (m, 1H), 6,95 (d,

$J = 7,8 \text{ Hz}$, 1H), 4,08 (m, 4H, 2x NCH₂), 3,32 (m, 2H, NCH₂), 2,55 (t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 2H, NCH₂), 2,47 (m, sob DMSO), 2,43 (s, 6H, 2xCH₃), 1,66 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 454 [M⁺].

5 Exemplo 58

(3-Imidazol-1-ilpropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (8 mg, 0,04 mmol) foi condensado com (3-imidazol-1-ilpropil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (10 mg) para produzir 10 mg (59%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,67 (s, br, 1H, NH), 10,96 (, br, 1H, NH), 8,16 (d, $J = 1,2 \text{ Hz}$, 1H), 7,81 (s, 1H, H-vinil), 7,65-7,72 (m, 4H), 7,44 (m, 3H), 7,31 (m, 1H, CONHCH₂), 7,21 (s, 1H, Ar-H), 4,02 (t, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H, NCH₂), 3,19 (q, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H, CONHCH₂), 2,44 (s, 6H, 2xCH₃), 1,93 (m, 2H, CH₂CH₂ CH₂).

MS-EI m/z 465 [M⁺].

Exemplo 59

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

6-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (0,08 g, 0,4 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,1 g) para produzir 65 mg (38%) do composto título como um sólido amarelo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 10,99 (, br, 1H, NH), 7,86 (d, $J = 7,8 \text{ Hz}$, 1H), 7,62-7,66

(m, 3H), 7,40-7,47 (m, 3H), 7,28-7,36 (m, 2H), 7,10 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 3,26 (m, 2H, NCH₂), 2,46-2,55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J = 7,2 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

5 MS-EI m/z 456 [M⁺].

Exemplo 60

(2-Pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

10 6-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (30 mg, 0,15 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (40 mg) para produzir 5,9 mg (8.5%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

15 ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, br, 1H, NH), 10,99 (, br, 1H, NH), 7,86 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,63-7,66 (m, 3H), 7,51 (m, 1H, CONHCH₂), 7,45 (m, 2H), 7,28-7,36 (m, 2H), 7,10 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 3,31 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,55 (t, J = 6,6 Hz, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂).

20 MS-EI m/z 454 [M⁺].

Exemplo 61

(3-Imidazol-1-ilpropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometol)-1H-pirrol-3-carboxílico

25 6-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (8 mg, 0,04 mmol) foi condensado com (3-imidazol-1-ilpropil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (10 mg) para produzir 7,3 mg (43%) do composto título como um sólido laranja.

30

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,62 (s, br, 1H, NH), 10,99 (s, br, 1H, NH), 7,86 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,62-7,70 (m, 5H), 7,45 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,30 (dd, J = 1,4 e 8,2 Hz, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,10 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 6,89 (s, 1H), 4,02 (t, J = 6,9 Hz, 2H, CH₂), 3,19 (m, 2H, NCH₂CH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 1,93 (t, J = 6,9 Hz, 2H, NCH₂).

MS-EI m/z 465 [M⁺].

Exemplo 62

10 (2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-[6-(3,5-diclorofenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(3,5-Diclorofenil)-1,3-diidroindol-2-ona (64 mg, 0,23 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de 15 ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (60 mg) para produzir 53 mg (44%) do composto título como um sólido marrom claro.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,62 (s, br, 1H, NH), 10,99 (s, 1H, NH), 7,89 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-4), 7,69-7,71 (m, 3H), 7,55 (m, 1H, CONHCH₂), 7,37 (m, 2H), 7,14 (d, J = 1,4 Hz, 1H, H-7), 3,27 (m, 2H, NCH₂), 2,48-2,58 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J = 6,8 Hz, 6H, 3xNCH₂CH₃).

MS m/z 526.9 [M⁺+1].

25 Exemplo 63

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-piridin-3-il-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

6-Piridin-3-il-1,3-diidroindol-2-ona (40 mg, 0,19 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 30

5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para produzir 29 mg (33%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,62 (s, br, 1H, NH),
 5 11,05 (s, br, 1H, NH), 8,86 (s, br, 1H), 8,53 (d, J = 5,8
 Hz, 1H), 8,04 (m, 1H), 7,91 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,70 (s,
 1H, H-vinil), 7,40-7,48 (m, 2H), 7,35 (d, J = 7,5 Hz, 1H),
 7,14 (s, 1H), 3,26 (m, 2H, NCH₂), 2,48-2,55 (m, 3xNCH₂),
 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,38 (s, 3H, CH₃), 0,96 (t, J = 6,9 Hz,
 10 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI m/z 457 [M⁺].

Exemplo 64

(2-Pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-
6-piridin-3-il-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-
 15 carboxílico

6-Piridin-3-il-1,3-diidroindol-2-ona (60 mg, 0,28 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (75 mg) para produzir 90 mg (71%) do composto título como um sólido
 20 laranja claro.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH),
 11,05 (s, br, 1H, NH), 8,86 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 8,54 (dd,
 J = 1,5 e 4,8 Hz, 1H), 8,05 (m, 1H), 7,91 (d, J = 7,8 Hz,
 1H), 7,70 (s, 1H, H-vinil), 7,44-7,53 (m, 2H), 7,36 (dd, J
 25 = 1,5 e 8,1 Hz, 1H), 7,15 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 3,33 (m, 2H,
 NCH₂), 2,47-2,57 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41
 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 455 [M⁺].

Exemplo 65

30 (3-Dimetilaminopropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-

6-piridin-3-il-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

6-Piridin-3-il-1,3-diidroindol-2-ona (42 mg, 0,2 mmol) foi condensado com (3-dimetilaminopropil)amida de
 5 ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para produzir 67 mg (75%) do composto título como um sólido marrom amarelado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 11,00 (s, br, 1H, NH), 8,86 (s, br, 1H), 8,54 (s, br, 1H),
 10 8,04 (m, 1H), 7,90 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,69 (s, 1H, H-vinil) 7,63 (m, 1H), 7,45-7,48 (m, 1H), 7,35 (dd, J = 1,7 e 8,0 Hz, 1H), 7,15 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 3,21-3,27 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,28 (m, 2H, NCH₂), 2,14 (s, 6H, 2xNCH₃), 1,64 (m, 2H, CH₂).

15 MS-EI m/z 443 [M⁺].

Exemplo 66

(3-Dimetilaminopropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

20 5-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (67 mg, 0,32 mmol) foi condensado com (3-dimetilaminopropil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (81 mg) para produzir 40 mg (28%) do composto título como um sólido laranja.

25 ¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,66 (s, br, 1H, NH), 10,92 (s, br, 1H, NH), 8,14 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,62 (m, 1H), 7,44 (m, 3H), 7,32 (m, 1H), 6,95 (m, 1H), 3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 6H, 2xCH₃), 2,27 (m, 2H, NCH₂), 2,13 (s, 6H, 2xNCH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂).

30 MS-EI m/z 442 [M⁺].

Exemplo 67

(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

5 5-Fenil-1,3-diidroindol-2-ona (1,5 g, 7,16 mmol) foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2 g) para produzir 1,3 g (40%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

10 ¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,64 (s, 1H, NH), 10,91 (s, 1H, NH), 8,14 (d, J = 1,4 Hz, 1H, ArH), 7,8 (s, 1H, ArH), 7,7 (dd, J = 1,2 e 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,6 (t, J = 5,3 Hz, 1H, CONHCH₂), 7,4 (m, 3H, ArH), 7,3 (t, J = 7,4 Hz, 1H, ArH), 6,9 (d, J = 8,0 Hz, 1H, ArH), 3,2 (m, 2H, CONHCH₂),
15 2,5 (m, 12H, 3xNCH₂ e 2xCH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, J = 6,7 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI m/z 470 [M⁺].

Exemplo 68

(3-dietilaminopropil)amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-6-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

20 6-fenil-1,3-diidroindol-2-ona (1,5 g, 7,16 mmol) foi condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (2 g) para
25 produzir 1,9 g (57%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,58 (s, 1H, NH), 10,94 (s, 1H, NH), 7,8 (d, J = 7,9 Hz, 1H, ArH), 7,6 (m, 4H, ArH), 7,4 (t, J = 7,5 Hz, 2H, ArH), 7,3 (m, 2H), 7,1 (d, J
30 = 1,4 Hz, 1H, ArH), 3,2 (m, 2H, CONHCH₂), 2,5 (m, 12H,

3xNCH₂ e 2xCH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, J = 6,7 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI m/z 470 [M⁺].

Exemplo 69

5 (3-Cloro-4-metoxifenil)amida de ácido 3-[4-(3-dietilamino-propilcarbamoil)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-4-carboxílico

(3-Cloro-4-metoxifenil)amida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-4-carboxílico (1 g, 3,16 mmol) foi
10 condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (1 g, 3,58 mmol) para produzir 1,7 g (85%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

MS-EI m/z 578.2 [M⁺].

15 Exemplo 70

(3-Dietilaminopropil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (0,5 g, 2,36 mmol) foi
20 condensado com (3-dietilaminopropil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (0,51 g) para produzir 0,84 g do composto título como um sólido laranja avermelhado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, 1H, NH), 10,99
25 (s, 1H, NH), 8,09 (d, J = 1,8 Hz, 1H, ArH), 7,7 (m, 4H), 7,2 (dd, J = 1,8 e 8,3 Hz, 2H, ArH), 6,8 (d, J = 7,8 Hz, 1H, ArH), 3,3 (br s, 4H, 2xNCH₂), 3,2 (m, 2H, CONHCH₂), 2,6 (br s, 2H, NCH₂ e 2xCH₃), 2,4 (s, 6H, 2xCH₃), 1,66 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,98 (t, J = 7,1 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

30 MS-EI m/z 472 e 474 [M⁺ -1 e M⁺+1].

Exemplo 71

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico

5 5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (100 mg, 0,47 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico (150 mg) para produzir 0,15 g (62%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

10 ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,97 (s, 1H, NH), 10,95 (s, 1H, NH), 8,09 (d, J = 1,3 Hz, 1H, ArH), 7,84 (m, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,23 (dd, J = 1,3 e 8,1 Hz, 1H, ArH), 6,8 (d, J = 8,1 Hz, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,3 (m, 3H, CH e NHCH₂), 2,5 (br m, 6H, 3xNCH₂), 1,28 (d, J = 6,9 Hz, 6H, 2xCH₃), 1,23 (d, J = 6,6 Hz, 6H, 2xCH₃), 0,96 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

MS-EI m/z 514 e 516 [M⁺-1 e M⁺+1].

Exemplo 72

(3-Dietilamino-propil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico

20 5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (90 mg, 0,42 mmol) foi condensado com (3-dietilamino-propil)amida de ácido 5-formil-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico (140 mg) para produzir 54 mg (25%) do composto título como um sólido marrom avermelhado.

30 ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,98 (s, 1H, NH), 10,96 (s, 1H, NH), 8,09 (d, J = 1,7 Hz, 2H), 7,78 (s, 1H, H-vinil), 7,23 (dd, J = 1,7 e 8,1 Hz, 1H, ArH), 6,82 (d, J = 8,1 Hz, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,25 (m, 2H, NHCH₂),

3,15 (m, 1H, CH), 2,7 (br s, 6H, 3xNCH₂), 1,7 (br m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1,28 (d, J = 6,9 Hz, 6H, 2xCH₃), 1,24 (d, J = 5,9 Hz, 6H, 2xCH₃), 1,06 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

MS-EI m/z 528 e 530 [M⁺-1 e M⁺+1].

5 Exemplo 73

(3-Pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (130 mg, 0,6 mmol) foi
10 condensado com (3-pirrolidin-1-ilpropil)amida de ácido 5-formil-2,4-diisopropil-1H-pirrol-3-carboxílico (150 mg, 0,45 mmol) para produzir 36 mg (15%) do composto título como um sólido laranja bronzeado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,98 (s, 1H, NH), 10,97
15 (s, 1H, NH), 8,10 (d, J = 1,6 Hz, 2H), 7,78 (s, 1H, H-vinil), 7,23 (dd, J = 1,6 e 7,6 Hz, 1H, ArH), 6,82 (d, J = 7,6 Hz, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,25 (m, 2H, NHCH₂), 3,15 (m, 1H, CH), 2,7 (br s, 6H, 3xNCH₂), 1,7 (br m, 6H, 3xNCH₂CH₂), 1,28 (d, J = 5,6 Hz, 6H, 2xCH₃), 1,24 (d, J =
20 5,7 Hz, 6H, 2xCH₃).

MS-EI m/z 526 e 528 [M⁺-1 e M⁺+1].

Exemplo 74

(Piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Bromo-1,3-diidroindol-2-ona (170 mg, 0,8 mmol) foi
condensado com (piridin-4-ilmetil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (200 mg) para produzir
25 14 mg (4%) do composto título como um sólido amarelo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,67 (s, 1H, NH), 11,01 (s, br, 1H, NH), 8,51 (dd, J = 1,6 e 4,3 Hz, 2H), 8,23 (t, J = 6,0 Hz, 1H, CONHCH₂), 8,11 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,78 (s, 1H, H-vinil), 7,31 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 7,25 (dd, J = 1,9 e 8,1 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 2H, NCH₂), 2,46 (s, 6H, 2xCH₃).

MS-EI m/z 450 e 452 [M⁺-1 e M⁺+1].

Exemplo 75

(2-Pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-[6-(4-butilfenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-[6-(4-Butilfenil)]-1,3-diidroindol-2-ona (50 mg, 0,19 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para produzir 74 mg (76%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,58 (s, 1H, NH), 10,93 (s, br, 1H, NH), 7,82 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,63 (s, 1H, H-vinil), 7,54 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,46 (m, 1H, CONH), 7,26 (m, 3H), 7,09 (s, 1H), 3,30 (m, 2H, CH₂), 2,52-2,63 (m, 4H, 2xCH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,68 (m, 4H, 2xCH₂), 1,58 (m, 2H, CH₂), 1,34 (m, 2H, CH₂), 0,91 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH₂CH₃).

MS-EI m/z 510 [M⁺].

Exemplo 76

(2-Pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-[6-(5-isopropil-2-metoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(5-Isopropil-2-metoxifenil)-1,3-diidroindol-2-ona (50 mg, 0,17 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-

iletil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (45 mg) para produzir 67 mg (75%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, 1H, NH), 10,82 (s, br, 1H, NH), 7,77 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,61 (s, 1H, H-vinil), 7,45 (m, 1H, CONH), 7,0-7,19 (m, 5H), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,32 (m, 2H, CH₂), 2,87 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2,56 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 4H, 2xCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,68 (m, 4H, 2xCH₂), 1,21 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS m/z 527.2 [M⁺+1].

Exemplo 77

(2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-[6-(4-etilfenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(4-Etilfenil)-1,3-diidroindol-2-ona (45 mg, 0,19 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para produzir 60 mg (65%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,59 (s, 1H, NH), 10,96 (s, br, 1H, NH), 7,83 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,64 (s, 1H, H-vinil), 7,51-7,56 (m, 3H), 7,25-7,30 (m, 3H), 7,08 (d, J = 1 Hz, 1H), 3,31 (m, 2H, CH₂), 2,63 (m, 2H, CH₂CH₃), 2,55 (m, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂), 1,20 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₂CH₃).

MS-EI m/z 482 [M⁺].

Exemplo 78

(2-Pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-[6-(2,4-dimetoxifenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(2,4-Dimetoxifenil)-1,3-diidroindol-2-ona (51 mg, 0,19 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para produzir 30 mg (31%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,59 (s, 1H, NH), 10,86 (s, br, 1H, NH), 7,75 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,60 (s, 1H, H-vinil), 7,49 (m, 1H, CONH), 7,22 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,03 (m, 1H), 6,97 (s, 1H), 6,58-6,65 (m, 2H), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,55 (m, 2H, CH₂), 2,50 (m, 4H, 2xCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,39 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 514 [M⁺].

Exemplo 79

(2-Pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-[6-(3-isopropilfenil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

6-(3-Isopropilfenil)-1,3-diidroindol-2-ona (48 mg, 0,19 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (50 mg) para produzir 59 mg (63%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,63 (s, 1H, NH), 10,97 (s, br, 1H, NH), 7,87 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,68 (s, 1H, H-vinil), 7,24-7,55 (m, 6H), 7,13 (s, 1H), 3,34 (m, 2H, CH₂), 3,30 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2,60 (m, 2H, CH₂), 2,50 (m, 4H, 2xCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 4H,

ácido hidrolórico 12N. A mistura foi agitada durante 12 horas a temperatura ambiente. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e lavados duas vezes com água. O produto foi seco sob vácuo para produzir 5-fluoro-1,3-diidro-indol-2-ona (600 g, 73 % de rendimento) como um pó marrom. $^1\text{H-NMR}$ (dimetilsulfoxeto- d_6) δ 3,46 (s, 2H, CH_2), 6,75, 6,95, 7,05 (3 x m, 3H, aromático), 10,35 (s, 1H, NH). MS m/z 152 [M+1].

2-Terc-butil éster 4-etil éster de ácido 3,5-dimetil-1H-pirrol-2,4-dicarboxílico (2.600 g) e etanol (7.800 mL) foram agitados vigorosamente enquanto ácido hidrolórico 10N (3.650 mL) foi adicionado lentamente. A temperatura aumentou de 25 °C para 35 °C e a evolução de gás começou. A mistura foi arrefecida até 54 °C e agitada com aquecimento adicional durante uma hora ao final da qual a temperatura era 67 °C. A mistura foi esfriada até 5 °C e 32 L de gelo e água foram lentamente adicionados com agitação. O sólido foi coletado por filtração a vácuo e lavado três vezes com água. O sólido foi seco ao ar até peso constante para produzir éster etílico de ácido 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (1.418 g, 87 % de rendimento) como um sólido rosado. $^1\text{H-NMR}$ (dimetilsulfoxeto- d_6) δ 2,10, 2,35 (2xs, 2x3H, 2x CH_3), 4,13 (q, 2H, CH_2), 6,37 (s, 1H, CH), 10,85 (s, 1H, NH). MS m/z 167 [M+1].

Dimetilformamida (322 g) e diclorometano (3.700 mL) foram esfriados em um banho de gelo até 4 °C e foi adicionado oxicloreto de fósforo (684 g) com agitação. Éster etílico de ácido 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico sólido (670 g) foi adicionado lentamente em alíquotas durante 15 minutos. A temperatura máxima alcançada foi 18 °

C. A mistura foi aquecida com refluxo durante uma hora, esfriada até 10 °C em um banho de gelo e 1,6 L de água gelada foi rapidamente adicionada com agitação vigorosa. A temperatura aumentou até 15 °C. Foi adicionado ácido
5 hidrocloreico 10 N (1,6 L) com agitação vigorosa. A temperatura aumentou até 22 °C. Permitiu-se que a mistura assentasse durante 30 minutos e que as camadas se separassem. A temperatura alcançou um máximo de 40 °C. A camada aquosa foi ajustada para pH 12-13 com hidróxido de
10 potássio 10N (3.8 L) a uma taxa que permitiu que a temperatura alcançasse e permanecesse em 55 °C durante a adição. Após término da adição, a mistura foi esfriada até
10 °C e agitada durante 1 hora. O sólido foi coletado por filtração a vácuo e lavado quatro vezes com água para
15 produzir éster etílico de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (778 g, 100 % de rendimento) como um sólido amarelo. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1,25 (t, 3H, CH₃), 2,44, 2,48 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4,16 (q, 2H, CH₂), 9,59 (s, 1H, CHO), 12,15 (br s, 1H, NH). MS m/z 195 [M+1].
20 Éster etílico de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (806 g), hidróxido de potássio (548 g), água (2.400 mL) e metanol (300 mL) foram refluídos durante duas horas com agitação e em seguida esfriados até 8 °C. A mistura foi extraída duas vezes com diclorometano.
25 A camada aquosa foi ajustada para pH 4 com 1.000 mL de ácido hidrocloreico 10N mantendo a temperatura abaixo de 15 °C. Foi adicionada água para facilitar a agitação. O sólido foi coletado por filtração a vácuo, lavado três vezes com água e seco sob vácuo a 50 °C para produzir ácido 5-formil-
30 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (645 g, 93.5 % de

rendimento) como um sólido amarelo. NMR (DMSO- d_6) δ 2,40, 2,43 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 9,57 (s, 1H, CHO), 12,07 (br s, 2H, NH+COOH), MS m/z 168 [M+1].

Ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
 5 (1.204 g) e 6.020 mL de dimetilformamida foram agitados a temperatura ambiente enquanto hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (2.071 g), hidroxibenzotriazol (1.460 g), trietilamina (2.016 mL) e dietiletilenodiamina (1.215 mL) foram adicionados. A
 10 mistura foi agitada durante 20 horas a temperatura ambiente. A mistura foi diluída com 3.000 mL de água, 2.000 mL de salmoura e 3.000 mL de solução de bicarbonato de sódio saturado e o pH ajustado para um valor acima de 10 com hidróxido de sódio 10N. A mistura foi extraída duas
 15 vezes com 5.000 mL de cada vez de metanol a 10% em dicloro metano e os extratos combinados, secos sobre sulfato de magnésio anidro e evaporados por rotação até secagem. A mistura foi diluída com 1.950 mL de tolueno e evaporada por rotação novamente até secagem. O resíduo foi triturado com
 20 hexano:éter dietílico 3:1 (4.000 mL). Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados duas vezes com 400 mL de acetato de etila e secos sob vácuo a 34 °C durante 21 horas para produzir (2-dietilamino-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (819 g, 43 % de
 25 rendimento) como um sólido marrom. ¹H-NMR (dimetilsulfoxeto- d_6) δ 0,96 (t, 6H, 2xCH₃), 2,31, 2,38 (2xs, 2 x CH₃), 2,51 (m, 6H 3xCH₂), 3,28 (m, 2H, CH₂), 7,34 (m, 1H, amida NH), 9,56 (s, 1H, CHO), 11,86 (s, 1H, pirrol NH), MS m/z 266 [M+1].
 30 (2-Dietilamino-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-

dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (809 g), 5-fluoro-1,3-diidro-indol-2-ona (438 g), etanol (8.000 mL) e pirrolidina (13 mL) foram aquecidos a 78 °C durante 3 horas. A mistura foi esfriada até temperatura ambiente e os sólidos coletados por filtração a vácuo e lavados com etanol. Os sólidos foram agitados com etanol (5.900 mL) a 72 °C durante 30 minutos. A mistura foi esfriada até temperatura ambiente. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com etanol e secos sob vácuo a 54 °C durante 130 horas para produzir (2-dietilamino-etil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (1.013 g, 88 % de rendimento) como um sólido laranja. ¹H-NMR (dimetilsulfoxido-d₆) δ 0,98 (t, 6H, 2xCH₃), 2,43, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,50 (m, 6H, 3xCH₂), 3,28 (q, 2H, CH₂), 6,84, 6,92, 7,42, 7,71, 7,50 (5xm, 5H, aromático, vinil, CONH), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,68 (s, 1H, pirrol NH), MS m/z 397 [M-1].

Exemplo 81

20 Ácido 3-[4-(2-dietilaminoetilcarbamoil)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico

Ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico (80 mg, 0,45 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para produzir 210 mg (92%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,6 (s, 1H, NH), 7,76 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H, H-vinil), 7,57 (dd, J = 1,5 e 8,0 Hz, 1H), 7,40-7,42 (m, 2H), 3,28 (m, 2H, CH₂), 2,88 (m,

H-piperidina), 2,54 (m, 6H, 3xCH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,56 (m, H-piperidina), 0,97 (t, J = 6,98 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 424 [M⁺].

5 Exemplo 82

2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-(5-dimetilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Dimetilamida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico (90 mg, 0,38 mmol) foi condensado com 2-pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para produzir 100 mg (54%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,65 (s, 1H, NH), 11,30 (s, br, 1H, NH), 8,25 (d, 1H), 7,92 (s, 1H, H-vinil), 7,48-7,53 (m, 2H), 7,07 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,61 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,56 (t, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 485 [M⁺].

Exemplo 83

(2-Pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-[5-(3-clorofenilsulfamoil)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

(3-Cloro-fenil)amida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico (120 mg, 0,38 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para produzir 150 mg (69%) do composto título como um sólido laranja amarelado.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,55 (s, 1H, NH), 11,26 (br s, 1H, NH), 10,30 (br s, 1H, NH), 8,26 (d, 1H), 7,79 (s, 1H, H-vinil), 7,51-7,57 (m, 2H), 7,22 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,15 (m, 1H), 7,07 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,44 (m, 2H, CH₂), 2,57 (t, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,68 (m, 4H, 2xCH₂).

MS m/z 568 [M⁺].

Exemplo 84

(2-Pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-5-(piridin-3-ilsulfamoil)-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico

Piridin-3-ilamida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico (110 mg, 0,38 mmol) foi condensado com (2-pirrolidin-1-iletíl)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para produzir 150 mg (74%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,58 (s, 1H, NH), 8,21 (d, J = 2,0 Hz, 2H), 8,04 (m, 1H), 7,76 (s, 1H, H-vinil), 7,49-7,54 (m, 2H), 7,41 (m, 1H), 7,14 (m, 1H), 6,94 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,56 (t, J = 7,06 Hz, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,43 (s, 6H, 2xCH₃), 1,68 (m, 4H, 2xCH₂).

MS m/z 535 [M⁺].

Exemplo 85

3-[3,5-Dimetil-4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-4-(2-hidroxietil)-1,3-diidroindol-2-ona

4-(2-Hidroxietil)-1,3-diidroindol-2-ona (71 mg, 0,4 mmol) foi condensado com 3,5-dimetil-4-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldeído para produzir 90 mg (55%) do composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,25 (s, 1H, NH), 10,88 (s, 1H, NH), 7,57 (s, 1H, H-vinil), 7,03 (m, 1H), 6,75-6,82 (m, 2H), 4,86 (m, 1H, OH), 3,70 (m, 2H, CH₂), 3,04 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 4H, 2xCH₂), 2,28 (br s, 7H), 2,19 (s, 3H, CH₃), 2,18 (s, 3H, CH₃),

MS m/z (+ve) 4,09,3 [M⁺].

Exemplo 86

Fenilamida de ácido 3-[3,5-dimetil-4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-

10 indol-5-sulfônico

Fenilamida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico (110 mg, 0,4 mmol) foi condensado com 3,5-dimetil-4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-1H-pirrol-2-carbaldeído (100 mg) para produzir 50 mg (24%) do composto

15 título como um sólido amarelo.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,52 (s, 1H, NH), 11,26 (s, 1H, NH), 10,08 (s, 1H, NH), 8,21 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,75 (s, 1H, H-vinil), 7,50 (dd, J = 1,6 e 8,3 Hz, 1H), 7,19 (m, 2H), 7,10 (m, 2H), 6,97 (m, 2H), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,28 (m, 10H, 2xCH₃ e 2xCH₂), 2,18 (s, 3H, CH₃).

20

MS-EI m/z 519 [M⁺].

Exemplo 87

(2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-(5-dimetilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-

25 3-carboxílico

Dimetilamida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-5-sulfônico (90 mg, 0,38 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para produzir 80 mg (43%) do

30 composto título como um sólido amarelo.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,30 (s, 1H, NH), 8,27 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H, H-vinil), 7,49 (dd, J = 1,7 e 8,0 Hz, 1H), 7,44 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7,07 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 3,26 (m, 2H, CH₂), 2,60 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,53 (m, 2H, CH₂), 2,45-2,50 (m, 10H, 2xCH₃ e N(CH₂CH₃)₂), 0,96 (t, J = 7,2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 487 [M⁺].

Exemplo 88

(2-Dietilaminoetil)amida de ácido 5-[5-(3-clorofenilsulfamoyl)-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

(3-Cloro-fenil)amida de ácido 2-oxo-2,3-diidro-1H-indole-5-sulfônico (120 mg, 3,8 mmol) foi condensado com (2-dietilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg) para produzir 80 mg (37%) do composto título como um sólido amarelo.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,55 (s, 1H, NH), 11,24 (s, 1H, NH), 10,29 (s, 1H, NH), 8,25 (d, J = 1,87 Hz, 1H), 7,79 (s, 1H, H-vinil), 7,52 (dd, J = 1,87 e 8,3 Hz, 1H), 7,42 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7,22 (t, J = 8,02 Hz, 1H), 7,15 (t, J = 2 Hz, 1H), 7,08 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,27 (m, 2H, CH₂), 2,48-2,57 (m, 6H, 3xCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 570.1 [M⁺].

Exemplo 95

Éster etílico de ácido 3-(2-oxo-5-fenil-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,74 (s, 1H, NH), 11,00 (s, 1H, NH), 8,13 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H, H-vinil), 7,70 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,49 (dd, J = 1,7 e 8,0

Hz, 1H), 7,44 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,32 (m, 1H), 6,96 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,26 (q, J = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,79 (m, 2H, CH₂), 2,72 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2xCH₂), 1,30 (t, J = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

5 MS-EI m/z 412 [M⁺].

Exemplo 99

Éster etílico de ácido 3-(2-oxo-5-fenilsulfamoi-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-carboxílico

10 ¹HNMNR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,64 (s, 1H, NH), 11,33 (s, 1H, NH), 10,07 (s, 1H, NH), 8,24 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H, H-vinil), 7,57 (dd, J = 1,8 e 8,0 Hz, 1H), 7,21 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,11 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,99 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,27 (q, J = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,80 (m, 2H, CH₂), 2,73 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2xCH₂), 1,30 (t, J = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 491 [M⁺].

Exemplo 109

20 Ácido 3-[3-(morfolina-4-carbonil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico

¹HNMNR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, 1H, NH), 12,75 (br s, 1H, COOH), 11,08 (s, 1H, NH), 7,85 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,71 (s, 1H, H-vinil), 7,62 (dd, J = 1,4 e 7,8 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 3,65 (m, 4H, 2xCH₂), 3,55 (m, 4H, 2xCH₂), 2,81 (m, 2H, CH₂), 2,54 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 421 [M⁺].

Exemplo 112

5-Bromo-3-[3-(pirrolidina-1-carbonil)-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno]-1,3-diidro-indol-2-ona

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,56 (s, 1H, NH), 11,00 (s, 1H, NH), 8,05 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H, H-vinil), 7,28 (dd, J = 1,3 e 8,3 Hz, 1H), 6,83 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 3,57 (m, 4H, 2xCH₂), 2,79 (m, 2H, CH₂), 2,65 (m, 2H, CH₂), 1,88 (m, 4H, 2xCH₂), 1,71 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 439 e 441 [M⁺-1] e [M⁺+1].

Exemplo 114

10 Ácido 3-(3-dimetilcarbamoil-4,5,6,7-tetraidro-2H-isoindol-1-ilmetileno)-2-oxo-2,3-diidro-1H-indol-6-carboxílico

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, 1H, NH), 12,72 (br s, 1H, COOH), 11,05 (s, 1H, NH), 7,85 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,72 (s, 1H, H-vinil), 7,62 (dd, J = 1,3 e 7,9 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 3,03 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,81 (m, 2H, CH₂), 2,55 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 379 [M⁺].

Exemplo 115

20 Ácido 4-metil-5-(5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) □ 13,56 (br s, 1H, NH), 8,24 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,86 (s, 1H, H-vinil), 7,74 (d, J = 2,96 Hz, 1H), 7,56 (dd, J = 1,5 e 8,1 Hz, 1H), 7,20 (br m, 1H, NHCH₃), 7,03 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 2,57 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃).

MS-EI m/z 361 [M⁺].

Exemplo 116

30 Éster etílico de ácido {[4-metil-5-(4-metil-5-metilsulfamoil-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético

Éster etílico de ácido 4-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (referência na literatura D.O. Cheng, T. L. Bowman e E. LeGoff; J. Heterocyclic Chem.; 1976; 13; 1145-1147) foi formilado usando o método A, hidrolisado usando
 5 o método B seguido por amidação (método C) para produzir éster etílico de ácido [(5-formil-4-metil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético.

4-Metil-5-metilaminossulfonil-2-oxindola (50 mg, 0,21 mmol) foi condensado com éster etílico de ácido [(5-formil-
 10 4-metil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético (100 mg, 0,42 mmol) e piperidina (0,1 mL) em metanol (2 mL) para produzir 50 mg (52%) do composto título.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,59 (s, 1H, NH), 11,29 (v,br, s, 1H, NH-CO), 8,33 (t, J = 5,8 Hz, 1H, CONHCH₂),
 15 7,83 (d, J = 3,11 Hz, 1H), 7,80 (s, 1H, H-vinil), 7,71 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,34 (br m, 1H, NHCH₃), 6,89 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,11 (q, J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,92 (d, J = 5,8 Hz, 2H, GlyCH₂), 2,86 (s, 3H, CH₃), 2,48 (s, 3H, CH₃), 2,42 (d, J = 4,71 Hz, 3H, HNCH₃), 1,20 (t, J = 7,1
 20 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 460 [M⁺].

Exemplo 117

Éster etílico de ácido {[4-metil-5-(5-metilsulfamoyl-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carbonyl]-
 25 amino}-acético

Uma mistura de 5-metilaminossulfonil-2-oxindola (0,06 g, 0,22 mmol), éster etílico de ácido [(5-formil-4-metil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético (0,075 g, 0,27 mmol) e piperidina (2 gotas) em etanol (5 mL) foi aquecida em um
 30 tubo selado a 90° C durante 12 horas. Após esfriamento, o

precipitado foi coletado por filtração a vácuo, lavado com etanol, triturado com diclorometano/éter e seco para produzir 0,035 g (36%) do composto título como um sólido marrom amarelado.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,6 (s, 1H, NH), 11 (v,br, s, 1H, NH-CO), 8,30 (t, J = 5,7 Hz, 1H, CONHCH₂), 8,25 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,88 (s, 1H, H-vinil), 7,84 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,57 (dd, J = 1,9 e 8,5 Hz, 1H), 7,14 (br m, 1H, NHCH₃), 7,04 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,11 (q, J = 6,7 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,92 (d, J = 5,7 Hz, 2H, GlyCH₂), 2,55 (s, 3H, CH₃), 2,41 (m, 3H, NCH₃), 1,20 (t, J = 6,7 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS m/z 446 [M⁺].

Exemplo 118

15 Ácido {[4-metil-5-(5-metilsulfamoyl-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carbonil]-amino}-acético

Uma mistura de éster etílico de ácido [(5-formil-4-metil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-acético (0,142 g, 0,59 mmol) e NaOH 1N (1,2 mL) em metanol (10 mL) foi agitada a 20 temperatura ambiente durante 1 hora. A reação foi concentrada e o resíduo foi condensado com 5-metilaminossulfonil-2-oxindola (0,13 g, 0,48 mmol) e piperidina (0,12 mL) em etanol (12 mL) para produzir 0,11 g (52%) do composto título.

25 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,98 (br s, 1H, NH), 8,17 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,75 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,51 (dd, J = 2 e 8,2 Hz, 1H), 7,21 (m on br s, 2H), 6,97 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,41 (d, J = 4,2 Hz, 2H, CH₂NH), 2,54 (s, 3H, pirrol-CH₃), 2,39 (s, 3H, ArCH₃).

30 MS m/z 417 [M-1]⁺.

Exemplo 120Ácido 5-metil-2-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,77 (br s, 1H, NH),
 5 12,49 (s, 1H, COOH), 11,07 (s, 1H, NH), 8,39 (s, 1H, H-
 vinil), 7,43 (d, J = 7,47 Hz, 1H), 7,20 (t, J = 7,47 Hz,
 1H), 7,03 (t, J = 7,47 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 7,47 Hz, 1H),
 6,49 (d, J = 1,53 Hz, 1H), 2,34 (s, 3H, CH₃).

MS m/z 269 [M+H]⁺.

10 **Exemplo 121**Éster etílico de ácido 5-metil-2-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,79 (s, 1H, NH), 11,08
 (s, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, H-vinil), 7,45 (d, J = 7,52 Hz,
 15 1H), 7,20 (t, J = 7,52 Hz, 1H), 7,03 (t, J = 7,52 Hz, 1H),
 6,91 (d, J = 7,52 Hz, 1H), 6,50 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 4,26
 (q, J = 7,2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 1,32 (t, J
 = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS m/z 297.1 [M+H]⁺.

20 **Exemplo 122**Éster etílico de ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,72 (s, 1H, NH), 11,16
 (s, 1H, NH), 8,29 (s, 1H, H-vinil), 7,53 (d, J = 2,0 Hz,
 25 1H), 7,35 (dd, J = 2,0 e 8,05 Hz, 1H), 6,87 (t, J = 8,05
 Hz, 1H), 6,53 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 4,28 (q, J = 7,03 Hz,
 2H, OCH₂CH₃), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,33 (t, J = 7,03 Hz, 3H,
 OCH₂CH₃).

MS m/z 375 e 377 [M+H]⁺.

30 **Exemplo 123**

Ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,72 (s, 1H, NH), 12,57 (s, 1H, COOH), 11,19 (s, 1H, NH), 8,36 (s, 1H, H-vinil), 7,51 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 7,34 (dd, J = 1,4 e 8,17 Hz, 1H), 6,87 (t, J = 8,17 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 2,35 (s, 3H, CH₃).

MS m/z 347 e 349 [M+H]⁺.

Exemplo 124

10 (2-Pirrolidin-1-iletíl)-amida de ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

A uma solução de ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (250 mg, 1,63 mmol) em dimetilformamida (3 mL) foi adicionado 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (376 mg, 1,2 equiv.), 1-hidroxibenzotriazol (265 mg, 1,2 equiv.), trietilamina (0,45 mL, 2 equiv.) e 1-(2-aminoetil)pirrolidina (0,23 mL, 1,1 equiv.). Após agitação a temperatura ambiente durante a noite, a reação foi diluída com bicarbonato de sódio saturado e salmoura (com sal extra) e extraída com metanol a 10% em diclorometano. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas sobre sulfato de sódio anidro e concentradas para produzir 130 mg de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico.

Uma mistura de 5-bromo-2-oxindol (106 mg, 0,5 mmol), (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (125 mg, 1 equiv.) e piperidina (0,2 mL) em etanol (2 mL) foi aquecida em um tubo selado a 80°C durante 1 hora e em seguida esfriado. O precipitado

que se formou foi coletado por filtração a vácuo, lavado com etanol e acetato de etila e seca para produzir o composto título como um sólido laranja.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,62 (s, 1H, NH), 11,06 (br s, 1H, NH), 8,56 (s, 1H, H-vinil), 8,15 (m, 1H, CONHCH₂), 7,48 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,31 (dd, J = 1,8 e 7,9 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,60 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 3,35 (m, 2H, HNCH₂CH₂), 2,56 (t, J = 6,91 Hz, 2H, HNCH₂CH₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS m/z 443/ 445 [M⁺ e M⁺+2].

Exemplo 125

(2-Dietilaminoetil)-amida de ácido 2-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico

A uma solução de ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (320 mg, 2,1 mmol) em dimetilformamida (3 mL) foi adicionado 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (483 mg, 1,2 equiv.), 1-hidroxibenzotriazol (340 mg, 1,2 equiv.), trietilamina (0,59 mL, 2 equiv.) e N,N-dietiletilenodiamina (0,32 mL, 1,1 equiv.). Após agitação a temperatura ambiente durante a noite, a reação foi diluída com bicarbonato de sódio saturado e salmoura (com sal extra) e extraída com metanol a 10% em diclorometano. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas sobre sulfato de sódio anidro e concentradas para produzir (2-dietilaminoetil)-amida de ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico.

Uma mistura de 5-bromo-2-oxindol (106 mg, 0,5 mmol), (2-dietilaminoetil)-amida de ácido 2-formil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (126 mg, 1 equiv.) e piperidina (0,2 mL) em etanol (2 mL) foi aquecida em um tubo selado a 80°C

durante 1 hora e em seguida esfriado. O precipitado foi coletado por filtração a vácuo, lavado com etanol e acetato de etila e seca para produzir o composto título como um sólido laranja.

5 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,62 (s, 1H, NH), 11,11 (br s, 1H, NH), 8,54 (s, 1H, H-vinil), 8,1 (m, 1H, CONHCH₂), 7,49 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,31 (dd, J = 2,2 e 8,3 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,58 (d, J = 2,24 Hz, 1H), 3,31 (m, 2H, HNCH₂CH₂), 2,59 (m, 6H, 3xCH₂), 2,36 (s, 10 3H, CH₃), 0,99 (t, J = 6,8 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 445/ 447 [M⁺ e M⁺+2].

Exemplo 126

(2-Dietilamino-etil)-amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

15 Uma mistura de 1,3-diidro-indol-2-ona (266 mg, 2 mmol), (2-dietilamino-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (530 mg, 2 mmol) e piperidina (1 gota) em etanol foi aquecida a 90°C durante 2 horas. A reação foi esfriada até temperatura ambiente, o 20 precipitado resultante foi coletado por filtração a vácuo, lavado com etanol e seco para produzir 422 mg (55%) do composto título como um sólido amarelo claro.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,7 (s, 1H, NH), 10,9 (s, 1H, NH), 7,88 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,64 (s, 1H, H-vinil), 7,41 (t, J = 5,4 Hz, 1H, NH), 7,13 (dt, J = 1,2 e 7,6 Hz, 1H), 6,99 (dt, J = 1,2 e 7,6 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 3,28 (m, 2H), 2,48-2,55 (m, 6H), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J = 7,2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

30 MS + ve APCI 381 [M⁺ + 1].

Exemplo 127

(2-Dietilamino-etil)-amida de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5 Uma mistura de 5-cloro-1,3-diidro-indol-2-ona (335 mg, 2 mmol), (2-dietilamino-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (530 mg, 2 mmol) e piperidina (1 gota) em etanol foi aquecida a 90°C durante 2 horas. A reação foi esfriada até temperatura ambiente, o
10 precipitado resultante foi coletado por filtração a vácuo, lavado com etanol e seco para produzir 565 mg (68%) do composto título como um sólido laranja.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,65 (s, 1H, NH), 11,0 (s, 1H, NH), 7,98 (d, J = 2,1 Hz, 1H) 7,77 (s, 1H H-vinil),
15 7,44 (t, NH), 7,13 (dd, J = 2,1 e 8,4 Hz, 1H) 6,87 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 3,28 (g, 2H), 2,48-2,53 (m, 6H), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS + ve APCI 415 [M⁺ + 1].

Exemplo 128

(2-Pirrolidin-1-etil)-amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

1,3-Diidro-indol-2-ona foi condensado com (2-pirrolidin-1-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para produzir o composto título.
25

MS + ve APCI 379 [M⁺ + 1].

Exemplo 129

(2-Pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
30

5-Fluoro-1,3-diidro-indol-2-ona foi condensado com (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para produzir o composto título.

5 MS + ve APCI 397 [M^+ + 1].

Procedimento de escalação

Ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (61 g), 5-fluoro-1,3-diidro-indol-2-ona (79 g), etanol (300 mL) e pirrolidina (32 mL) foram refluídos durante 4,5
10 horas. Ácido acético (24 mL) foi adicionado à mistura e o refluxo continuou durante 30 minutos. A mistura foi esfriada até temperatura ambiente e os sólidos coletados por filtração a vácuo e lavados duas vezes com etanol. Os sólidos foram agitados durante 130 minutos em acetona a 40%
15 em água (400 mL) contendo ácido hidrocloreico 12N (6.5 mL). Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e lavados duas vezes com acetona a 40% em água. Os sólidos foram secos sob vácuo para produzir ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-
20 carboxílico (86 g, 79 % de rendimento) como um sólido laranja. $^1\text{H-NMR}$ (dimetilsulfoxido- d_6) δ 2,48, 2,50 (2xs, 6H, 2xCH₃), 6,80, 6,88, 7,68, 7,72 (4xm, 4H, aromático e vinil), 10,88 (s, 1H, CONH), 12,12 (s, 1H, COOH), 13,82 (s, 1H, pirrol NH), MS m/z 299 [M-1].

25 Ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilideno-metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 g) e dimetilformamida (500 mL) foram agitados e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfônio (221 g), 1-(2-
30 aminoetil)pirrolidina (45,6 g) e trietilamina (93 mL) foram

adicionados. A mistura foi agitada durante 2 horas a temperatura ambiente. O produto sólido foi coletado por filtração a vácuo e lavado com etanol. Os sólidos foram lavados da pasta suspensa por agitação em etanol (500 mL) durante uma hora a 64° C e esfriados a temperatura ambiente. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com etanol e secos sob vácuo para produzir (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (101,5 g, 77 % de rendimento). ¹H-NMR (dimetilsulfoxido-d₆) δ 1,60 (m, 4H, 2xCH₂), 2,40, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,50 (m, 4H, 2xCH₂), 2,57, 3,35 (2xm, 4H, 2XCH₂), 7,53, 7,70, 7,73, 7,76 (4xm, 4H, aromático e vinil), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,67 (s, 1H, pirrol NH), MS m/z 396 [M+1].

Exemplo 130

(2-Pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Cloro-1,3-diidro-indol-2-ona foi condensado com (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para produzir o composto título.

MS + ve APCI 413 [M⁺ + 1].

Exemplo 131

(2-Dimetilaminoetil)-amida de ácido 2,4-dimetil-5-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-1H-pirrol-3-carboxílico

1,3-Diidro-indol-2-ona foi condensado com (2-dimetilamino-etil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para produzir o composto título.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,63 (s, 1H, NH), 10,90

(s, 1H, NH), 7,78 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,63 (s, 1H H-vinil), 7,48 (t, 1H, NH), 7,13 (dt, 1H), 6,98 (dt, 1H), 6,88 (d, J=7,7 Hz, 1H), 3,31 (q, J=6,6 Hz, 2H), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J=6,6 Hz, 2H), 2,19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS + ve APCI 353 [M⁺ + 1].

Exemplo 132

(2-Dimetilaminoetil)-amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

5-Fluoro-1,3-diidro-indol-2-ona foi condensado com (2-dimetilaminoetil)amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para produzir o composto título.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,68 (s, 1H, NH), 10,90 (s, 1H, NH), 7,76 (dd, J = 2,4 e 9,4 Hz, 1H), 7,71 (s, 1H H-vinil), 7,51 (t, 1H, NH), 6,93 (m, 1H), 6,84 (dd, J=4,6 e 8,4 Hz, 1H), 3,31 (q, J=6,6 Hz, 2H), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J=6,6 Hz, 2H), 2,19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂)

MS + ve APCI 371 [M⁺ + 1].

Exemplo 193

(2-Etilamino-etil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

(2-Etilamino-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (99 g), etanol (400 mL), 5-fluoro-2-oxindola (32 g) e pirrolidina (1,5 g) foram refluídos durante 3 horas com agitação. A mistura foi esfriada até temperatura ambiente e os sólidos coletados por filtração a vácuo. Os sólidos foram agitados em etanol

a 60° C, esfriados até temperatura ambiente e coletados por filtração a vácuo. O produto foi seco sob vácuo para produzir (2-etilamino-etil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (75 g, 95 % de rendimento). ¹H-NMR (dimetilsulfoxido-d₆) δ 1,03 (t, 3H, CH₃), 2,42, 2,44 (xs, 6H, 2xCH₃), 2,56 (q, 2H, CH₂), 2,70, 3,30 (2xt, 4H, 2xCH₂), 6,85, 6,92, 7,58, 7,72, 7,76 (5xm, 5H, aromático, vinil e CONH), 10,90 (br s, 1H, CONH), 13,65 (br s, 1H, pirrol NH).

MS m/z 369 [M-1].

Exemplo 195

(2-Dietil-N-oxoamino-etil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

15 Método A:

(2-Dietilamino-etil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (598 mg) e diclorometano (60 mL) em um banho de gelo foram tratados com ácido 3-cloroperbenzóico (336 mg) e a mistura agitada a temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi evaporado por rotação e o resíduo suspenso em metanol (20 mL). Foi adicionada água (20 mL) contendo hidróxido de sódio (240 mg) e a mistura foi agitada durante 1 hora. O precipitado foi coletado por filtração a vácuo, lavado com 5 mL de água e seco sob vácuo para produzir (2-dietil-N-oxoamino-etil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (510 mg, 82 % de rendimento) como um sólido laranja. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 13,72 (br s, 1H, NH), 11,02 (br s, 1H, CONH), 9,81 (br s,

1H, CONH), 7,75 (dd, 1H, aromático), 7,70 (s, 1H, aromático), 6,93 (td, 1H, aromático), 6,84 (m, 1H, aromático), 3,63 (m, 2H, CH₂), 3,29 (m, 2H, CH₂), 3,14 (m, 4H, 2xCH₂), 2,47 (s, 1H, CH₃), 2,45 (s, 3H, CH₃), 1,64 (t, 5 6H, 2xCH₃). MS m/z 415 [M+1].

Método B:

(2-Dietilamino-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboílico (10 g) foi suspenso em diclorometano (100 mL) e esfriado em um banho de gelo. Foi 10 adicionado ácido 3-cloro-peroxibenzóico (13,1 g) com agitação e permitiu-se que a mistura esfriasse até temperatura ambiente e em seguida foi agitada durante a noite. A mistura foi evaporada por rotação até secar e cromatografada em uma coluna de sílica gel purificando com 15 metanol a 20% em diclorometano. Frações contendo o produto foram combinadas e evaporadas por rotação até secagem para produzir (2-dietil-N-oxoamino-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (9 g, 83 % de rendimento).

20 (2-Dietil-N-oxoamino-etil)-amida de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (9 g), 5-fluoro-1,3-diidro-indol-2-ona (9 g, 83 % de rendimento) e pirrolidina ((9 g, 83 % de rendimento (0.1 g)) foram refluídos em etanol (30 mL) durante 4 horas. A mistura foi esfriada em 25 um banho de gelo e o precipitado coletado por filtração a vácuo e lavado com etanol. Os sólidos foram agitados em acetato de etila (30 mL), coletados por filtração a vácuo, lavados com acetato de etila e secos sob vácuo para produzir (2-dietil-N-oxoamino-etil)-amida de ácido 5-[5- 30 fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-

dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (10,3g 80 % de rendimento) como um sólido laranja. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 13,72 (br s, 1H, NH), 11,02 (br s, 1H, CONH), 9,81 (br s, 1H, CONH), 7,75 (dd, 1H, aromático), 7,70 (s, 1H, aromático), 6,93 (td, 1H, aromático), 6,84 (m, 1H, aromático), 3,63 (m, 2H, CH_2), 3,29 (m, 2H, CH_2), 3,14 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2,47 (s, 1H, CH_3), 2,45 (s, 3H, CH_3), 1,64 (t, 6H, $2\times\text{CH}_3$). MS m/z 415 [M+1].

Exemplo 190

10 [2-(Piridin-1-il)etil]-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (120 mg, 0,4 mmol) foi agitado com EDC, HCl (96 mg, 0,5 mmol), 1-hidroxibenzotriazol anidro (68 mg, 0,5 mmol) e 2-(2-aminoetilpiridina adquirida de Aldrich em DMF anidro (3 mL) durante 2-3 dias a temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída com NaHCO_3 1M (1,5 ml), em seguida com 8 mL de água. O produto precipitado bruto foi coletado por filtração, lavado com água, seco e purificado por cristalização ou cromatografia para produzir [2-(piridin-1-il)-etil]amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

25 **Exemplo 189**

[2-(Piridin-1-il)etil]amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

30 Procedendo como descrito no exemplo anterior mas substituindo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-

ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico por ácido
5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-
dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (127 mg) forneceu [2-
(piridin-1-il)etil]amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-
5 diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-
carboxílico.

Exemplo 192

[2-(Piridin-1-il)etil]amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-
diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-
10 carboxílico

Procedendo como descrito no Exemplo 190 acima mas
substituindo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-
ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico por ácido
5-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-
15 dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (145 mg) forneceu [2-
(piridin-1-il)etil]amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-
diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-
carboxílico.

Exemplo 191

[2-(Piridin-1-il)etil]amida de ácido 5-[2-oxo-1,2-diidro-
indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-
20 carboxílico

Procedendo como descrito no Exemplo 190 acima mas
substituindo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-
25 ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico por ácido
5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-
1H-pirrol-3-carboxílico (113 mg) forneceu [2-(piridin-1-
il)etil]amida de ácido 5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-
ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

30 Exemplo 203

[2-(Piridin-1-il)etil]amida de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Procedendo como descrito no Exemplo 190 acima mas substituindo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico por ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (123 mg) forneceu [2-(piridin-1-il)etil]amida de ácido 5-[5-ciano-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

Exemplos 142, 186, 187, 188 e 204

Procedendo como nos Exemplos 190, 189, 191, 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina por 1-(2-aminoetil)pirrolidina, adquirida de Aldrich Chemical Company, Inc. propiciou os compostos desejados.

Exemplos 143-147

Procedeu-se como nos Exemplos 190, 189, 191, 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina por 1-(2-aminoetil)imidazolin-2-ona (preparada por aquecimento de carbonato dimetílico com bis(2-aminoetil) amina (2 equivalentes) em um frasco selado até 150 °C durante 30 minutos, seguindo o procedimento descrito na Patente U.S. 2613212 (1950), de Rohm e Haas Co. O produto bruto foi purificado sobre sílica utilizando uma mistura purificadora clorofórmio-metanol-amônia aquosa 80:25:2) forneceu os compostos desejados.

Exemplos 148-151 e 184

Procedendo como nos Exemplos 190, 189, 191, 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina por éster

etílico de ácido 4-(2-aminoetil)piperazina-1-acético (preparado como segue: éster etílico de ácido piperazina-1-acético (11,22 g) foi tratado com iodoacetoneitrila (5,0 mL) na presença de carbonato de potássio (6,9 g) em acetato de etila (260 mL) a 0 °C. Após adição completa da iodoacetoneitrila (45 minutos), a mistura de reação foi subsequente agitada a temperatura ambiente durante 11 horas. A mistura de reação foi filtrada e o filtrado evaporado. O resíduo foi hidrogenado na presença de boreto de cobalto (preparado a partir de CoCl_2 e boroidreto de sódio) a temperatura ambiente a $3,447 \times 10^5$ Pa durante 2 dias em etanol. Filtração, evaporação e purificação por cromatografia utilizando uma mistura purificadora clorofórmio-metanol-amônia aquosa 80:25:2 forneceu a amina desejada (3,306 g) como um óleo amarelo pálido) forneceu os compostos desejados.

Exemplos 152-153

Procedendo como descrito nos Exemplos 190, 189, 191, 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina por 2-[(2-aminoetilamino)]acetoneitrila (preparada como segue: uma solução iodoacetoneitrila (50 mmol) em álcool etílico (80 ml) foi adicionado a uma solução de etileno diamina (150 ml) em álcool etílico (60 ml) a 0 °C durante um período de 30 minutos. A agitação continuou por mais uma hora a 0 °C, em seguida a temperatura ambiente durante 14 horas. Foi adicionado 55 mmol de carbonato de potássio, agitado durante 30 minutos, filtrado e o filtrado foi concentrado a temperatura ambiente. O resíduo foi purificado sobre sílica utilizando uma mistura purificadora clorofórmio-metanol-amônia aquosa 80:15:1.5 para produzir

2-[(2-aminoetilamino)]-acetonitrila (3,550 g) que foi usada imediatamente) forneceu os compostos desejados.

Exemplos 154-158

Procedendo como descrito nos Exemplos 190, 189, 191,
5 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina por 1-(3-aminopropil)-azepin-2-ona (preparado de acordo com o procedimento em Kraft A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14, exceto que a hidrólise de DBU foi realizada a 145°C exatos na presença de hidróxido de lítio
10 1 hora, 5 mL de DBU, 2 mL de água, 420 mg de hidrato de hidróxido de lítio). Purificação do produto bruto sobre sílica utilizando uma mistura de purificação clorofórmio-metanol-amônia aquosa 80:40:4 forneceu 1-(3-aminopropil)azepin-2-ona (4,973g, 87 % de rendimento))
15 forneceu os compostos desejados.

Exemplos 133-135, 159 e 200

Procedendo como descrito nos Exemplos 190, 189, 191, 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina por N-acetil etileno diamina, (preparada por aquecimento de
20 uma mistura de acetato de etila com etileno diamina (1,5 equivalentes) até 160 °C durante 1 hora em um recipiente selado. A destilação a vácuo propiciou produto desejado com rendimento de 56%. N-acetiletileno diamina é também disponível de Aldrich) forneceu os compostos desejados.

25 Exemplos 146-140

Procedendo como descrito nos Exemplos 190, 189, 191, 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina por 1-(3-aminopropil)-tetraidro-pirimidin-2-ona (preparada do mesmo modo que 1-(3-aminopropil)-azepin-2-ona de acordo
30 com o procedimento em Kraft A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans.

1, 6, 1999, 705-14: Em resumo, 1,3,4,6,7,8-hexaidro-2H-pirimido[1,2-a]pirimidina (4,939 g), hidrato de hidróxido de lítio (918 mg) e 2 mL de água foi aquecida sem um solvente em um recipiente selado até 145 °C durante 1 hora.

5 O produto bruto foi purificado em uma coluna de sílica em clorofórmio-metanol-amônia aquosa 80:40:4 para produzir amina pura (5,265g, 94% de rendimento).

Exemplos 141, 160-162 e 185

Procedendo como descrito nos Exemplos 190, 189, 191,

10 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina por 1-(2-aminoetil)-piperazina-2-ona (preparada como segue: Cloreto de terc-butildifenilsilila não-diluído (25 mL, 97,7 mmol) foi adicionado gota-a-gota a uma solução de DBU (19,5 mL, 130 mmol) e bis(2-aminoetil)amina (4,32 mL, 40 mmol) em

15 acetamida dimetílica anidra (80 mL) a temperatura ambiente após esfriamento em um banho de água em 5 minutos. A mistura foi agitada durante 5 horas. Éster etílico de ácido bromoacético (6,70 mL, 60 mmol) foi adicionado puro após esfriamento a temperatura ambiente. A reação foi agitada

20 durante 25 minutos, em seguida evaporada a alto vácuo. O resíduo foi dissolvido em metanol (200 mL), KHCO_3 (10 g) e KF (12 g, 200 mmol) foram adicionados e a mistura foi agitada a 60 °C durante 5 horas. 10 g de Na_2CO_3 foram adicionados, agitados durante 10 minutos, esfriados e

25 filtrados. Os filtrados foram evaporados. O resíduo foi extraído com hexanos (2 vezes 250 mL). O material insolúvel em hexano foi dissolvido em etanol (60 mL), filtrado e evaporado. O resíduo foi purificado em uma coluna de sílica em clorofórmio-metanol-amônia aquosa 80:40:4 para produzir

amina pura (4,25 g, 74% de rendimento)) forneceu os compostos desejados.

Exemplos 163-167

Procedendo como descrito nos Exemplos 190, 189, 191,
5 192 e 203 acima mas substituindo 2-(2-aminoetil)piridina
por 3-[(2-aminoetil)aminol]propionitrila (preparada a partir
de etileno diamina (150 mmol) e acrilonitrila (50 mmol) em
THF a temperatura ambiente, como descrito em Israel, M. e
outros: J. Med Chem. 7, 1964, 710-16., forneceu a amina
10 desejada (4,294 g)) forneceu os compostos desejados.

Exemplo 168

[2-(4-metilpiperazin-1-il)-etil]-amida de ácido 5-(5-
fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-
1H-pirrol-3-carboxílico

15 A uma mistura lodosa amarela agitada de ácido 5-[5-
fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-
dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (90 mg), DMF (0,8 mL) e TEA
(0,084 mL) em um tubo de reação de 20 mL, foi adicionado
reagente BOP (199 mg). A mistura tornou-se límpida em 5
20 minutos. Foi adicionada 2-(4-metilpiperazin-1-il)etilamina¹
(51 mg) à mistura límpida. A solução resultante foi agitada
a temperatura ambiente durante a noite. Produtos sólidos
amarelos precipitaram a partir do sistema de reação.
Cromatografia de camada fina (10% de metanol em cloreto de
25 metano) mostrou que todo o material de partida tinha sido
convertido no produto. O sólido foi isolado por filtração a
vácuo e lavado uma vez com etanol (1 mL). O sólido foi
dissolvido em éter dietílico (2 mL) durante 20 minutos e
coletado por filtração a vácuo. Após secar sob vácuo, foi
30 obtido (4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-

fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (79 mg, 62% de rendimento).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2,41 (m, 2H, CH₂), 2,47 (m, 8H, 4xCH₂), 3,30 (m, 2H, CH₂), 6,82 (dd, J=4,5, 8,7Hz, 1H), 6,91 (td, ²J=2,4, ³J=8,8Hz, 1H), 7,43 (t, J=5,6Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,75 (dd, J=2,8, 9,6Hz, 1H) (aromático e vinil), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,67 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 424,4 (M-1).

Exemplo 169

10 (4-Metilpiperazin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Segundo o procedimento no Exemplo 168 acima mas substituindo ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico por ácido
15 -[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (95 mg, 0,3 mmol) produziu (4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (76 mg, 58%).
20

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,41, 2,42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4xCH₂), 3,30 (m, 2H, CH₂), 6,84 (d, J=8,0Hz, 1H), 7,11 (dd, J=2,0, 8,0Hz, 1H), 7,44 (t, J=5,6Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,97 (d, J=2,0Hz, 1H) (aromático e vinil), 10,98 (s, 1H, CONH),
25 13,62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 440,2 (M-1).

Exemplo 170

(4-Metilpiperazin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico
30

Seguindo o procedimento descrito no Exemplo 168, mas substituindo ácido 5-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico por ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico produziu (4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (39 mg, 54%) que foi obtido a partir de SU011670 (54 mg, 0,15 mmol).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,14 (s, 3H, CH₃), 2,41, 2,42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4xCH₂), 3,31 (m, 2H, CH₂), 6,80 (d, J=8,0Hz, 1H), 7,23 (dd, J=2,0, 8,0Hz, 1H), 7,44 (t, J=5,6Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,09 (d, J=2,0Hz, 1H) (aromático e vinil), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,61 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 486,6 (M).

Exemplo 172

(4-Metilpiperazin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Seguindo o procedimento descrito no Exemplo 168 acima, mas substituindo ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico SU014900 por ácido 5-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico produziu (4-metilpiperazin-1-il-etil)-amida de ácido 5-(2-oxo-1,2-diidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico, SU14903 (136 mg, 84%) que foi obtido a partir de SU012120 (112,8 mg, 0,4 mmol).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,39, 2,42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4xCH₂), 3,30

(t, 2H, CH₂), 6,86 (d, J=8,0Hz, 1H), 6,96 (t, J=7,4 Hz, 1H), 7,10 (t, J=7,8Hz, 1H), 7,41 (t, J=5,4Hz, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,76 (d, J=7,6Hz, 1H) (aromático e vinil), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,61 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 406,6 (M-1).

5 Exemplo 171

[2-(3,5-Dimetilpiperazin-1-il)etil]amida de ácido 5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

A uma mistura lodosa amarela agitada de ácido 5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (112,8 mg, 0,4 mmol), DMF (0,5 mL) e trietilamina (0,111 mL) em um tubo de reação de 20 mL, foi adicionado reagente BOP (265 mg). A mistura ficou límpida em 5 minutos. 2-(2,6-dimetilpiperazin-1-il)etilamina (68,6 mg) (Vide, Tapia, L. Alonso-Cires, P. Lopez-Tudanca, R. Mosquera, L. Labeaga, A. Innerarity, A. Orjales, J. Med. Chem., 1999, 42, 2870-2880) foi adicionada à mistura límpida. A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente durante a noite. Cromatografia de camada fina (metanol a 10% em cloreto de metileno) mostrou que todo o material de partida tinha sido convertido no produto. A mistura de reação foi evaporada até secar e em seguida purificada por cromatografia de descarga luminosa (CH₂Cl₂/CH₃OH=20/1-15/1) seguida por recristalização para produzir [2-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)etil]amida de ácido 5-[2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (83 mg, 50% de rendimento).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,15, 1,16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1,95 (t, J=11,6Hz, 2H, CH₂), 2,41, 2,47 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,50 (m, 2H, CH₂), 3,03 (d, J=10Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m,

2H, CH₂), 6,86 (d, J=8,0Hz, 1H), 6,97 (t, J=7,2 Hz, 1H), 7,11 (t, J=7,8Hz, 1H), 7,48 (t, J=5,6 Hz, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,75 (d, J=7,6 Hz, 1H) (aromático e vinil), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 422,2 (M+1).

5 Exemplo 173

[2-(3,5-Dimetilpiperazin-1-il)etil)amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-diidro -indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Segundo o procedimento descrito no Exemplo 168
10 acima, foi obtido o composto desejado (60 mg, 0,2 mmol).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 0,891, 0,907 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1,49 (t, J=10,4Hz, 2H), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2,41 (m, 2H, CH₂), 2,74 (m, 4H), 3,30 (m, 2H), 6,82 (dd, J=4,5, 8,7Hz, 1H), 6,90 (td, ²J=2,4, ³J=8,4Hz, 1H), 7,42 (t, J=5,6Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,74 (dd, J=4,6, 8,4Hz, 1H) (aromático e vinil), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,65 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 438,4 (M-1).

Exemplo 174

[2-(3,5-Dimetilpiperazin-1-il)etil)amida de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Segundo o procedimento descrito no Exemplo 171
acima, foi obtido o composto desejado (31,2 mg, 34%) a
partir de ácido 5-[5-cloro-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-
25 ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (63 mg,
0,2 mmol).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,15, 1,16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1,95 (t, J=11,6Hz, 2H, CH₂), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,50 (m, 2H, CH₂), 3,03 (d, J=11,2Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m, 2H, CH₂), 6,85 (d, J=8,4Hz, 1H), 7,11 (dd, J=2,0,

8,0Hz,1H), 7,52 (t, J=5,6Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,97 (d, J=2,0Hz, 1H) (aromático e vinil), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,63 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 456,2 (M+1).

Exemplo 175

5 [2-(3,5-Dimetilpiperazin-1-il)etil]amida de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Seguindo o procedimento descrito no Exemplo 171 acima, foi obtido o composto desejado (40 mg, 40%) a partir
10 de ácido 5-[5-bromo-2-oxo-1,2-diidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (74 mg, 0,2 mmol).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,15, 1,16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1,95 (t, J=11,6Hz, 2H, CH₂), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,50
15 (m, 2H, CH₂), 3,03 (d, J=10,4Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m, 2H, CH₂), 6,81 (d, J=8,4Hz, 1H), 7,24 (dd, J=2,0, 8,4Hz, 1H), 7,51 (t, J=5,6Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,10 (d, J=2,0Hz, 1H) (aromático e vinil), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 498,4 (M-1).

20 EXEMPLOS BIOLÓGICOS

Os testes que se seguem são utilizados para encontrar aqueles compostos que apresentem o grau ótimo da atividade desejada.

A. Procedimentos do Teste

25 Os testes que se seguem podem ser utilizados para determinar o nível de atividade e efeito dos diferentes compostos da presente invenção em um ou mais das PKs. Testes similares podem ser realizados para qualquer PK que utilize técnicas bem conhecidas na técnica.

Diversos testes descritos aqui são realizados em um formato ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Sandwich Assay) (Teste Imunosorvente Compacto Ligado por Enzimas) (Voller e outros, 1980, "Enzyme Linked Immunosorbent Assay", Manual de Imunologia Clínica, 2ª Ed., Rose e Friedman, Am. Soc. of Microbiology, Washington, D.C., pp. 359-371). O procedimento genérico é como se segue: um composto é introduzido em células que expressem a quinase do teste, ou naturalmente ou de modo recombinante, por um período de tempo selecionado após o qual, se a quinase do teste for um receptor, é adicionado um ligante conhecido para ativar o receptor. As células são lisadas e o lisato é transferido para as cavidades de uma placa ELISA previamente revestida com um anticorpo específico que reconhece o substrato da reação de fosforilação enzimática. Componentes de não-substrato do lisato das células são removidos e a quantidade de fosforilação no substrato é detectada com uma fosfotirosina especificamente reconhecedora de anticorpos comparada com células de controle que não foram contatadas com um composto do teste.

Os protocolos presentemente preferidos para realizar os testes ELISA para PKs específicas são fornecidos abaixo. Contudo, a adaptação destes protocolos para determinar a atividade de compostos contra outras RTKs, bem como CTKs e STKs, enquadra-se no âmbito do conhecimento daqueles versados na técnica. Outros testes descritos aqui medem a quantidade de DNA produzido em resposta à ativação de uma quinase de teste, que é uma medida genérica de uma resposta proliferativa. O procedimento genérico para este teste é como se segue: um composto é introduzido em células que

expresssem a quinase do teste, ou naturalmente ou de modo recombinante, por um período de tempo selecionado após o qual, se a quinase do teste for um receptor, é adicionado um ligante conhecido para ativar o receptor. Após incubação
5 pelo menos durante a noite, é adicionado um reagente rotulador de DNA tal como 5-bromodeoxiuridina (BrdU) ou H³-timidina. A quantidade de DNA rotulado é detectada com um anticorpo anti-BrdU ou através de medição de radioatividade e é comparada com células de controle não contatadas com um
10 composto do teste.

BIOTESTE GST-FLK-1

Este teste analisa a atividade da tirosina quinase de GST-FLK-1 sobre poli(glu, tir) peptídeos.

Materiais e Reagentes:

15 1. Placas ELISA Corning de 96 cavidades (Catálogo Corning No. 5805-96).

2. Poli(glu, tir) 4:1, liofilizado (Catálogo Sigma No. P0275).

3. Preparação de placas de teste revestidas com
20 poli(glu, tir) (pEY): revestir 2 µg/cavidade de poli(glu, tir) (pEY) em 100 µL de PBS, manter a temperatura ambiente durante 2 horas ou a 4°C durante a noite. Cobrir bem placas para impedir evaporação.

4. Solução Tampão PBS: para 1 L misturar 0,2 g de
25 KH₂PO₄, 1,15 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KCl e 8 g de NaCl em aproximadamente 900 mL de dH₂O. Quando todos os reagentes tiverem dissolvido, ajustar o pH até 7,2 com HCl. Levar o volume total até 1 L com dH₂O.

5. Solução Tampão PBST: a 1 L de solução tampão PBS
30 adicionar 1,0 mL de Tween-20.

6. Solução Tampão de Bloqueio TBB: para 1 L misturar 1,21 g de TRIS, 8,77 g de NaCl, 1 mL de TWEEN-20 em aproximadamente 900 mL de dH₂O. Ajustar o pH até 7,2 com HCl. Adicionar 10 g de BSA, agitar até dissolver. Levar o
5 volume total até 1 L com dH₂O. Filtrar para remover matéria particulada.

7. BSA 1% em PBS: para fazer uma solução de trabalho 1x, adicionar 10 g de BSA a aproximadamente 990 mL de solução tampão PBS, agitar para dissolver. Ajustar o volume
10 total até 1 L com solução tampão PBS, filtrar para remover matéria particulada.

8. Hepes 50 mM pH 7,5.

9. GST-FLk1cd purificado a partir da transformação do baculovírus recombinante sf9 (SUGEN, Inc.).

15 10. DMSO 4% em dH₂O.

11. ATP 10 mM em dH₂O.

12. MnCl₂.40 mM

13. Solução Tampão de Diluição de Quinase (KDB): misturar 10 mL de Hepes (pH 7,5), 1 mL de NaCl 5 M, 40 µL
20 de ortovanadato de sódio 100 mM e 0,4 mL de BSA 5% em dH₂O com 88,56 mL de dH₂O.

14. Placas de fundo em V de polipropileno de 96 cavidades NUNC, Catálogo Científico Aplicado #AS-72092.

15. EDTA: misturar 14,12 g de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a aproximadamente 70 mL
25 de dH₂O. Adicionar NaOH 10 N até que EDTA se dissolva. Ajustar o pH para 8,0. Ajustar o volume total para 100 mL com dH₂O.

16. Primeira Solução Tampão de Diluição de Anticorpo: misturar 10 mL de BSA 5% em solução tampão PBS com 89,5 mL de TBST.

17. Anticorpo monoclonal antifosfotirosina conjugado a peroxidase horseradish (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech).

18. Ácido 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS, Moss, Cat. No. ABST).

19. SDS 10%.

Procedimento:

10 1. Revestir placas ELISA de 96 cavidades Corning com 2 µg de poliEY peptídeo em PBS esterilizado como descrito na etapa 3 de Materiais e Reagentes.

2. Remover líquido não-retido das cavidades invertendo a placa. Lavar uma vez com TBST. Bater de leve a 15 placa em toalha de papel para remover o líquido em excesso.

3. Adicionar 100 µl de BSA 1% em PBS a cada cavidade. Incubar, com agitação, durante 1 h a temperatura ambiente.

4. Repetir a etapa 2.

5. Embeber as placas com HEPES 50 mM (pH 7,5) (150 20 µL/cavidade).

6. Diluir o composto do teste com dH₂O/DMSO 4% até 4 vezes a concentração desejada do teste final em placas de polipropileno de 96 cavidades.

7. Adicionar 25 µL do composto do teste diluído à 25 placa ELISA. Nas cavidades de controle, colocar 25 µL de dH₂O/DMSO 4%.

8. Adicionar 25 µL de MnCl₂ 40 mM com 4x ATP (2 µM) a cada cavidade.

9. Adicionar 25 µL EDTA 0,5 M às cavidades de 30 controle negativo.

10. Diluir GST-Flk-1 em 0,005 µg (5 ng)/cavidade com KDB.

11. Adicionar 50 µL de enzima diluída a cada cavidade.

5 12. Incubar, com agitação, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

13. Interromper a reação adicionando 50 µL de EDTA 250 mM (pH 8,0).

10 14. Lavar 3X com TBST e bater de leve a placa na toalha de papel para remover o líquido em excesso.

15 15. Adicionar 100 µL de conjugado HRP antifosfotirosina por cavidade, diluição de 1:5.000 em solução tampão de diluição de anticorpo. Incubar, com agitação, durante 90 min a temperatura ambiente.

16. Lavar como na etapa 14.

17. Adicionar 100 µL de solução ABTS a temperatura ambiente a cada cavidade.

18. Incubar, com agitação, durante 10 a 15 minutos. Remover quaisquer bolhas.

20 19. Interromper a reação adicionando 20 µL de SDS 10% a cada cavidade.

20. Ler resultados na leitora ELISA Dynatech MR7000 com filtro de teste a 410 nM e filtro de referência a 630 nM.

25 Bioteste PYK2

Este teste é utilizado para medir a atividade da quinase *in vitro* de pyk2 de comprimento total marcado com epítopo HA em um teste ELISA.

Materiais e Reagentes:

30 1. Placas ELISA Corning de 96 cavidades.

2. Anticorpo anti-HA monoclonal 12CA5 (SUGEN, Inc.).

3. PBS (Salina Tamponada de Fosfato da Dulbecco (Catálogo Gibco # 450-1300EB)).

4. Solução Tampão TBST: para 1 L, misturar 8,766 g de NaCl, 6,057 g de TRIS e 1 mL de Triton X-100 0,1% em aproximadamente 900 mL de dH₂O. Ajustar o pH para 7,2, ajustar o volume para 1 L.

5 Solução Tampão de Bloqueio: para 1 L, misturar 100 g de BSA 10%, 12,1 g de TRIS 100 mM, 58,44 g de NaCl 1 M e 10 mL de TWEEN-20 1%.

6. FL.pyk2-HA provenientes de lisatos de células sf9 (SUGEN, Inc.).

7. DMSO 4% em H₂O MilliQue.

8. ATP 10 mM em dH₂O.

15 9. MnCl₂ 1 M.

10. MgCl₂ 1 M.

11. Ditioneitol (DTT) 1 M.

12. Fosforilação de solução tampão de quinase 10x: misturar 5,0 mL de Hepes 1 M (pH 7,5), 0,2 mL de MnCl₂ 1 M, 1,0 mL MgCl₂ 1 M, 1,0 mL Triton X-100 10% em 2,8 mL de dH₂O. Imediatamente antes da utilização, adicionar 0,1 mL de DTT 1 M.

13. Placas de fundo em V de polipropileno de 96 cavidades NUNC.

25 14. EDTA 500 mM em dH₂O.

15. Solução tampão de diluição de anticorpo: para 100 mL, 1 mL BSA/PBS 5% e 1 mL de Tween-20 10% em 88 mL de TBS.

16. HRP-anti-Ptyr conjugado PY99, Santa Cruz Biotech Cat. No. SC-7020.

30 17. ABTS, Moss, Cat. No. ABST-2000.

18. SDS 10%.

Procedimento:

1. Revestir as placas ELISA Corning de 96 cavidades com 0,5 µg de anticorpo anti-HA 12CA5 por cavidade em 100 µL de PBS. Armazenar durante a noite a 4°C.
2. Remover anticorpo HA não-retido das cavidades invertendo a placa. Lavar placa com dH₂O. Bater de leve a placa em toalha de papel para remover o líquido em excesso.
3. Adicionar 150 µl de Solução Tampão de Bloqueio a cada cavidade. Incubar, com agitação, durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Lavar placa 4x com TBS-T.
5. Diluir lisato em PBS (1,5 µg de lisato/100 µL de PBS).
6. Adicionar 100 mL de lisato diluído a cada cavidade. Agitar a temperatura ambiente durante 1 h.
7. Lavar como na etapa 4.
8. Adicionar 50 µL de Solução Tampão de Quinase 2x à placa ELISA que contém pyk2-HA capturado.
9. Adicionar 25 µL do composto do teste 400 µM em DMSO 4% a cada cavidade. Para cavidades de controle utilizar DMSO 4% isoladamente.
10. Adicionar 25 µL de EDTA 0,5 M às cavidades de controle negativo.
11. Adicionar 25 µL de ATP 20 µM a todas as cavidades. Incubar com agitação durante 10 minutos.
12. Interromper a reação adicionando 25 µL de EDTA 500 mM (pH 8,0) a todas as cavidades.
13. Lavar como na etapa 4.

14. Adicionar 100 µL de anti-Ptyr conjugado HRP, diluição de 1:6.000 em Solução Tampão de Diluição de Anticorpo a cada cavidade. Incubar, com agitação, durante 1 h a temperatura ambiente.

5 15. Lavar placa 3x com TBST e 1x com PBS.

16. Adicionar 100 µL de solução ABTS a cada cavidade.

17. Se necessário, interromper a reação de desenvolvimento adicionando 20 µL de SDS 10% a cada cavidade.

10 18. Ler placa na leitora ELISA com filtro de teste a 410 nM e filtro de referência a 630 nM.

BIOTESTE FGFR1

Este teste é utilizado para medir a atividade da quinase *in vitro* de FGF1-R em um teste ELISA.

15 **Materiais e Reagentes:**

1. Placas ELISA de 96 cavidades Costar (Catálogo Corning # 3369).

2. Poli(Glu, Tir) (Catálogo Sigma # PO275).

3. PBS (Catálogo Gibco # 450-1300EB).

20 4. Solução Tampão Hepes 50 mM.

5. Solução Tampão de Bloqueio (BSA/PBS 5%).

6. GST-FGFR1 purificado (SUGEN, Inc.).

7. Solução Tampão de Diluição de Quinase.

Misturar 500 µL de Hepes 1 M (GIBCO), 20 µL de
25 BSA/PBS 5%, 10 µL de ortovanadato de sódio 100 mM e 50 µL de NaCl 5 M.

8. ATP 10 mM.

9. Mistura de fosforilação ATP/MnCl₂: misturar 20 µL de ATP, 400 µL de MnCl₂ 1 M e 9,56 mL de dH₂O.

10. Placas de fundo em V de polipropileno de 96 cavidades NUNC, Catálogo Científico Aplicado #AS-72092.

11. EDTA 0,5 M.

12. TBST 0,05%.

5 Adicionar 500 µL de TWEEN a 1 litro de TBS.

13. Soro anti-fosfotirosina policlonal de coelho (SUGEN, Inc.).

14. Conjugado de peroxidase IgG anti-coelho de cabra (Biosource, Catálogo # ALI0404).

10 15. Solução de ABTS.

16. Solução de ABTS/H₂O₂.

Procedimento:

1. Revestir placas ELISA Costar de 96 cavidades com 1 µg de Poly(Glu, Tir) por cavidade em 100 µL de PBS.

15 Armazenar durante a noite a 4°C.

2. Lavar placas revestidas uma vez com PBS.

3. Adicionar 150 µL de Solução Tampão de Bloqueio de BSA/PBS 5% a cada cavidade. Incubar, com agitação, durante 1 h a temperatura ambiente.

20 4. Lavar placa 2x com PBS, em seguida uma vez com Hepes 50 mM.

Bater de leve as placas em uma toalha de papel para remover líquido em excesso e bolhas.

25 5. Adicionar 25 µL do composto do teste 0,4 mM em DMSO 4% ou DMSO 4% isoladamente (controles) à placa.

6. Diluir GST-FGFR1 purificado em Solução Tampão de Diluição de Quinase (5 ng de quinase/50 µL de KDB/cavidade).

7. Adicionar 50 µL de quinase diluída a cada cavidade.

30 8. Iniciar a reação de quinase adicionando 25 µL/cavidade de ATP/Mn⁺⁺ recentemente preparados (0,4 mL de

MnCl₂ 1 M, 40 µL de ATP 10 mM, 9,56 mL de dH₂O), recentemente preparados.

9. Esta é uma reação de quinase rápida e deve ser interrompida com 25 µL de EDTA 0,5 M em um modo similar à
5 adição de ATP.

10. Lavar a placa 4x com TBST novo.

11. Formar Solução Tampão de Diluição de Anticorpo: por 50 mL: misturar 5 mL de BSA 5%, 250 µl de leite 5% e 50 µl de vanadato de sódio 100 mM, ajustar volume final com
10 TBST 0,05%.

12. Adicionar 100 µL por cavidade de anti-fosfotirosina (diluição em ADB 1:10.000). Incubar, com agitação, durante 1 h a temperatura ambiente.

13. Lavar como na etapa 10.

15 14. Adicionar 100 µl por cavidade de conjugado de peroxidase IgG anti-coelho de cabra (diluição de 1:6.000 em ADB).

Incubar, com agitação, durante 1 h a temperatura ambiente.

20 15. Lavar como na etapa 10 e em seguida com PBS para remover bolhas e TWEEN em excesso.

16. Adicionar 100 µL de solução ABTS/H₂O₂ a cada cavidade.

17. Incubar, com agitação, durante 10 a 20 minutos.
25 Remover quaisquer bolhas.

18. Ler resultados na leitora ELISA Dynatech MR7000: filtro de teste a 410 nm e filtro de referência a 630 nm.

BIOTESTE EGFR

Este teste é utilizado para medir a atividade da
30 quinase *in vitro* de FGF1-R em um teste ELISA.

Materiais e Reagentes:

1. Placas ELISA Corning de 96 cavidades.
2. Anticorpo anti-EGFR monoclonal SUM01 (SUGEN, Inc.).
- 5 3. PBS.
4. Solução Tampão TBST.
5. Solução Tampão de Bloqueio: para 100 mL, misturar 5,0 g de Leite® sem gordura instantâneo Carnation com 100 mL de PBS.
- 10 6. Lisato de células A431 (SUGEN, Inc.).
7. Solução tampão de TBS:
8. TBS + DMSO 10%: para 1 L, misturar 1,514 g de TRIS, 2,192 g de NaCl e 25 mL de DMSO; ajustar o volume total para 1 litro com dH₂O.
- 15 9. ATP (Adenosina-5'-trifosfato, a partir de músculo de Equino, Cat. Sigma No. A-5394), solução 1,0 mM em dH₂O.
10. MnCl₂ 1,0 mM.
11. Mistura de fosforilação ATP/MnCl₂: para fazer 10 mL, misturar 300 µL de ATP 1 mM, 500 µL de MnCl₂ e 9,2 mL
- 20 de dH₂O.
- Preparar logo antes de usar, manter em gelo.
12. Placas inferiores de polipropileno de 96 cavidades V NUNC.
13. EDTA.
- 25 14. Soro anti-fosfotirosina policlonal de coelho (SUGEN, Inc.).
15. Conjugado de peroxidase IgG anti-coelho de cabra (Biosource, Catálogo # ALI0404).
16. ABTS.
- 30 17. Peróxido de hidrogênio 30%.

18. ABTS/H₂O₂.

19. HCl 0,2 M.

Procedimento:

1. Revestir as placas ELISA Corning de 96 cavidades
5 com 0,5 µg de SUMO1 em 100 µL de PBS por cavidade,
armazenar durante a noite a 4°C.

2. Remover SUMO1 não-retido das cavidades invertendo
a placa para remoção do líquido. Lavar 1x com dH₂O. Bater
de leve a placa em toalha de papel para remover o líquido
10 em excesso.

3. Adicionar 150 µl de Solução Tampão de Bloqueio a
cada cavidade.

Incubar, com agitação, durante 30 min a temperatura
ambiente.

15 4. Lavar placa 3x com água desionizada, em seguida
uma vez com TBST. Bater de leve a placa em toalha de papel
para remover o líquido em excesso e bolhas.

5. Diluir lisato em PBS (7 µg de lisato/100 µL de
PBS).

20 6. Adicionar 100 µL de lisato diluído a cada
cavidade. Agitar a temperatura ambiente durante 1 h.

7. Lavar placas como na etapa 4, acima.

8. Adicionar 120 µL de TBS à placa ELISA que contém
EGFR capturado.

25 9. Diluir o composto do teste 1:10 em TBS, colocar em
cavidade.

10. Adicionar 13,5 µL do composto de teste diluído à
placa ELISA. Às cavidades de controle, adicionar 13,5 µL de
TBS em DMSO 10%.

11. Incubar, com agitação, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Adicionar 15 μL de mistura de fosforilação a todas as cavidades exceto a cavidade de controle negativo.
- 5 O volume final das cavidades deve ser de aproximadamente 150 μL com uma concentração final de 3 μM de ATP/MnCl_2 5 mM em cada cavidade. Incubar com agitação durante 5 minutos.
13. Interromper a reação adicionando 16,5 μL de solução EDTA durante agitação. Agitar por mais 1 min.
- 10 14. Lavar 4x com água desionizada, 2x com TBST.
- 15 15. Adicionar 100 μL de antifosfotirosina (diluição de 1:3.000 em TBST) por cavidade. Incubar, com agitação, durante 30-45 min a temperatura ambiente.
- 16 16. Lavar como em 4, acima.
- 15 17. Adicionar 100 μL por cavidade de conjugado de peroxidase IgG anti-coelho de cabra (diluição de 1:2.000 em TBST) por cavidade.
- Incubar, com agitação, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 20 18. Lavar como em 4, acima.
19. Adicionar 100 μL de solução ABTS/ H_2O_2 a cada cavidade.
20. Incubar, com agitação, durante 5 a 10 minutos. Remover quaisquer bolhas.
- 25 21. Se necessário, interromper a reação adicionando 100 μL de HCl 0,2 M por cavidade.
22. Ler resultados na leitora ELISA Dynatech MR7000: filtro de teste a 410 nM, filtro de referência a 630 nM.

BIOTESTE PDGFR

Este teste é utilizado para medir a atividade da quinase *in vitro* de FGF1-R em um teste ELISA.

Materiais e Reagentes:

1. Placas ELISA Corning de 96 cavidades.
- 5 2. Anticorpo anti-PDGFR monoclonal 28D4C10 (SUGEN, Inc.).
3. PBS.
4. Solução Tampão TBST.
5. Solução Tampão de Bloqueio (a mesma do bioteste
- 10 EGFR).
6. Lisato de células NIH 3T3 de expressão PDGFR- β (SUGEN, Inc.).
7. Solução tampão de TBS.
8. TBS + DMSO 10%.
- 15 9. ATP.
10. $MnCl_2$.
11. Mistura de fosforilação de solução tampão de quinase: para formar 10 mL, misturar 250 μ L de TRIS 1 M, 200 μ L de NaCl 5 M, 100 μ L de $MnCl_2$ 1 M e 50 μ L de Triton
- 20 X-100 100 mM em dH_2O suficiente para formar 10 mL.
12. Placas de fundo em V de polipropileno de 96 cavidades NUNC.
13. EDTA.
14. Soro anti-fosfotirosina policlonal de coelho
- 25 (SUGEN, Inc.).
15. Conjugado de peroxidase IgG anti-coelho de cabra (Biosource, Catálogo # ALI0404).
16. ABTS.
17. Peróxido de hidrogênio, solução 30%.
- 30 18. ABTS/ H_2O_2 .

19. HCl 0,2 M.

Procedimento:

1. Revestir as placas ELISA Corning de 96 cavidades com 0,5 µg de 28D4C10 em 100 µL de PBS por cavidade,
5 armazenar durante a noite a 4°C.

2. Remover 28D4C10 não-retido das cavidades invertendo a placa para remoção do líquido. Lavar 1x com dH₂O. Bater de leve a placa em toalha de papel para remover o líquido em excesso.

10 3. Adicionar 150 µl de Solução Tampão de Bloqueio a cada cavidade. Incubar, com agitação, durante 30 min a temperatura ambiente.

4. Lavar placa 3x com água desionizada, em seguida uma vez com TBST. Bater de leve a placa em toalha de papel
15 para remover o líquido em excesso e bolhas.

5. Diluir lisato em HNTG (10 µg de lisato/100 µL de HNTG).

6. Adicionar 100 µL de lisato diluído a cada cavidade. Agitar a temperatura ambiente durante 60 min.

20 7. Lavar placas como descrito na Etapa 4.

8. Adicionar 80 µL de solução tampão de quinase de trabalho à placa ELISA que contém EGFR capturado.

9. Diluir o composto do teste 1:10 em TBS, em placas de polipropileno de 96 cavidades.

25 10. Adicionar 10 µL do composto de teste diluído à placa ELISA. Às cavidades de controle, adicionar 10 µL de TBS + DMSO 10%. Incubar, com agitação, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

11. Adicionar 10 µL de ATP diretamente a todas as
30 cavidades exceto a cavidade de controle negativo (o volume

final das cavidades deve ser de aproximadamente 100 µl com ATP 20 µM em cada cavidade). Incubar durante 30 minutos com agitação.

12. Interromper a reação adicionando 10 µL de solução
5 EDTA a cada cavidade.

13. Lavar 4x com água desionizada, duas vezes com TBST.

14. Adicionar 100 µL de antifosfotirosina (diluição de 1:3.000 em TBST) por cavidade. Incubar, com agitação,
10 durante 30-45 min a temperatura ambiente.

15. Lavar como na Etapa 4.

16. Adicionar 100 µl por cavidade de conjugado de peroxidase IgG anti-coelho de cabra (diluição de 1:2.000 em TBST) por cavidade.

15 Incubar, com agitação, durante 30 min a temperatura ambiente.

17. Lavar como na Etapa 4.

18. Adicionar 100 µL de solução ABTS/H₂O₂ a cada cavidade.

20 19. Incubar, com agitação, durante 10 a 30 minutos. Remover quaisquer bolhas.

20. Se necessário, interromper a reação adicionando 100 µL de HCl 0,2 M por cavidade.

21. Ler resultados na leitora ELISA Dynatech MR7000
25 com filtro de teste a 410 nM e filtro de referência a 630 nM.

TESTE DE QUINASE HER-2 CELULAR

Este teste é utilizado para medir a atividade da quinase HER2 em células inteiras em um formato ELISA.

30 Materiais e Reagentes:

1. DMEM (Catálogo GIBCO #11965-092).
2. Soro fetal bovino (FBS, Catálogo GIBCO #16000-044), inativado termicamente em um banho de água durante 30 min a 56°C.
- 5 3. Tripsina (Catálogo GIBCO #25200-056).
4. L-Glutamina (Catálogo GIBCO #25030-081).
5. HEPES (Catálogo GIBCO #15630-080).
6. Meios de cultura.
- Misturar 500 mL de DMEM, 55 mL de FBS inativado
- 10 termicamente, 10 mL de HEPES e 5,5 mL de L-Glutamina.
7. Meios de Secagem.
- Misturar 500 mL de DMEM, 2,5 mL de FBS inativado
- termicamente, 10 mL de HEPES e 5,5 mL de L-Glutamina.
8. PBS.
- 15 9. Placas de microtitulação de cultura de tecido de
- 96 cavidades de Fundo Plano (Catálogo Corning #25860).
10. Pratos de Cultura de Tecido com 15 cm (Catálogo
- Corning #08757148).
11. Placas ELISA Corning de 96 cavidades.
- 20 12. Placas de fundo em V de polipropileno de 96
- cavidades NUNC.
13. Cartuchos de Transferência Costar para a Transtar
- 96 (Catálogo Costar #7610).
14. SUM01: anticorpo anti-EGFR monoclonal (SUGEN,
- 25 Inc.).
15. Solução Tampão TBST.
16. Solução Tampão de Bloqueio: Leite® Instantâneo
- Carnation 5% em PBS.
17. Ligante EGF: EGF-201, Shinko American, Japão.

Suspender o pó em 100 μ L de HCl 10 mM. Adicionar 100 μ L de NaOH 10 mM. Adicionar 800 μ L de PBS e transferir para um tubo Eppendorf, armazenar a -20°C até que esteja pronto para uso.

5 18. Solução Tampão HNTG Lysis.

Para 5X de HNTG de Estoque, misturar 23,83 g de Hepes, 43,83 g de NaCl, 500 mL de glicerol e 100 mL de Triton X-100 e dH_2O suficiente para formar 1 L de solução total. Para 1x de HNTG*, misturar 2 mL de HNTG, 100 μ L de
10 Na_3VO_4 0,1 M, 250 μ L de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,2 M e 100 μ L de EDTA.

19. EDTA.

20. Na_3VO_4 . Para fazer uma solução de estoque, misturar 1,84 g de Na_3VO_4 com 90 mL de dH_2O . Ajustar o pH para 10. Ferver em microondas durante 1 minuto (a solução
15 torna-se transparente). Esfriar até temperatura ambiente. Ajustar o pH para 10. Repetir o ciclo de aquecimento/esfriamento até que o pH permaneça em 10.

21. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 200 mM.

22. Antisoro policlonal de coelho específico para
20 fosfotirosina (anticorpo anti-Ptyr, SUGEN, Inc.).

23. Conjugado de peroxidase IgG anti-coelho de cabra (Biosource, Catálogo # ALI0404).

24. Solução de ABTS.

25. Solução de peróxido de hidrogênio 30%.

26. ABTS/ H_2O_2 .

27. HCl 0,2 M.

Procedimento:

1. Revestir as placas ELISA Corning de 96 cavidades com SUMO1 a 1,0 μg por cavidade em PBS, 100 μ L de volume
30 final/cavidade. Armazenar durante a noite a 4°C .

2. No dia da utilização, remover a solução tampão de revestimento e lavar a placa 3 vezes com dH₂O e uma vez com solução tampão TBST. Todas as lavagens neste teste devem ser realizadas desta maneira, a não ser que especificado em
5 contrário.

3. Adicionar 100 µL de Solução tampão de bloqueio a cada cavidade. Incubar a placa, com agitação, durante 30 min a temperatura ambiente. Imediatamente antes da utilização, lavar a placa.

10 4. Utilizar linha de células EGFr/HER-2 chimera/3T3-C7 para este teste.

5. Escolher pratos que possuam 80-90% de confluência. Coletar células através de tripsinização e centrifugar a 1.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min.

15 6. Suspender novamente as células em meio de secagem e contar com Azul de Tripán. É necessária uma viabilidade de aproximadamente 90%. Colocar as células no meio de secagem a uma densidade de 2.500 células por cavidade, 90 µL por cavidade, em uma placa de microtitulação de 96
20 cavidades. Incubar as células semeadas durante a noite a 37° sob CO₂ 5%.

7. Iniciar o teste dois dias após semeadura.

8. Os compostos do teste são dissolvidos em DMSO 4%. Em seguida as amostras são ainda mais diluídas diretamente
25 sobre as placas com DMEM seco. Tipicamente, esta diluição será de 1:10 ou mais. Em seguida todas as cavidades são transferidas para a placa das células a uma diluição adicional de 1:10 (10 µL de amostra e meios em 90 µL de meios de secagem). A concentração final de DMSO deve ser de

1% ou menos. Pode ser utilizada também uma diluição em série padrão.

9. Incubar sob CO₂ 5% a 37°C durante 2 horas.

10. Preparar o ligante EGF diluindo o EGF de estoque (16,5 µM) em DMEM morno até 150 nM.

11. Preparar HNTG* novo suficiente para 100 µL por cavidade; colocar em gelo.

12. Após 2 horas de incubação com o composto do teste, adicionar o ligante EGF preparado às células, 50 µL por cavidade, para uma concentração final de 50 nM. As cavidades de controle positivo recebem a mesma quantidade de EGF. Os controles negativos não recebem EGF. Incubar a 37°C durante 10 min.

13. Remover os compostos do teste, EGF e DMEM. Lavar as células uma vez com PBS.

14. Transferir HNTG* para as células, 100 µL por cavidade. Colocar em gelo durante 5 minutos. Entretanto, remover a solução tampão da placa ELISA e lavar.

15. Raspar as células da placa com uma micropipeta e homogeneizar o material das células aspirando e distribuindo repetidamente a solução tampão HNTG* lysis. Transferir o lisato para uma placa ELISA revestida, bloqueada, lavada. Ou utilizar um cartucho de transferência Costar para transferir o lisato para a placa.

16. Incubar, com agitação, a temperatura ambiente durante 1 h.

17. Remover o lisato, lavar. Transferir o anticorpo anti-Ptyr recentemente diluído (1:3.000 em TBST) para a placa ELISA, 100 µL por cavidade.

18. Incubar, com agitação, a temperatura ambiente durante 30 min.

19. Remover o anticorpo anti-Ptyr, lavar. Transferir o anticorpo BIOSOURCE recentemente diluído para a placa ELISA (1:8.000 em TBST, 100 µL por cavidade).

20. Incubar, com agitação, a temperatura ambiente durante 30 min.

21. Remover o anticorpo BIOSOURCE, lavar. Transferir a solução ABST/H₂O₂ recentemente preparada para a placa ELISA, 100 µL por cavidade.

22. Incubar, com agitação, durante 5-10 minutos. Remover quaisquer bolhas.

23. Interromper a reação com a adição de 100 µL de HCl 0,2 M por cavidade.

24. Ler resultados na leitora ELISA Dynatech MR7000 com filtro de teste a 410 nM e filtro de referência a 630 nM.

TESTE CDK2/CICLINA A

Este teste é utilizado para medir a atividade da quinase *in vitro* de cdk2/ciclina A humana em um Teste de Proximidade de Cintilação (SPA).

Materiais e Reagentes:

1. Placas Wallac de polietileno tereftalato de 96 cavidades (flexi) (Catálogo Wallac #1450-401).

2. [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP de Amersham Redivue (Catálogo Amersham #AH 9968).

3. Gotas de polivinil tolueno SPA revestidas de Amersham Streptavidin (Catálogo Amersham #RPNQ 0007). As gotas devem ser reconstituídas em PBS sem magnésio ou cálcio, a 20 mg/ml.

4. Complexo de enzima cdk2/ciclina A ativada purificada a partir de células Sf9 (SUGEN, Inc.).

5. O substrato de peptídeo biotinilado (Debtide). O peptídeo biotin-X-PKTPKKAKKL é dissolvido em dH₂O a uma
5 concentração de 5 mg/mL.

6. Mistura de peptídeo/ATP: para 10 mL, misturar 9,979 mL de dH₂O, 0,00125 mL de ATP "frio", 0,010 mL de debtide e 0,010 mL de $\gamma^{33}\text{P}$ ATP. A concentração máxima por
10 cavidade será de 0,5 μM de ATP "frio", 0,1 μg de Debtide e 0,2 μCi de $\gamma^{33}\text{P}$ ATP.

7. Solução tampão de quinase: para 10 mL, misturar 8,85 mL de dH₂O, 0,625 mL de TRIS (pH 7,4), 0,25 mL de MgCl₂ 1 M, 0,25 mL de NP40 10% e 0,025 mL de DTT 1 M, adicionados frescos imediatamente antes da utilização.

15 8. ATP 10 mM em dH₂O.

9. Tris 1 M, pH ajustado para 7,4 com HCl.

10. MgCl₂ 1 M.

11. DTT 1 M.

12. PBS (Catálogo Gibco #14190-144).

20 13. EDTA 0,5 M.

14. Interromper a solução: para 10 mL, misturar 9,5 mL de PBS, 0,005 mL de ATP 100 mM, 0,1 mL de EDTA 0,5 M, 0,1 mL de Triton X-100 10% e 1,25 mL de gotas de SPA 20 mg/mL.

25 Procedimento:

1. Preparar soluções dos compostos do teste a 5x a concentração final desejada em DMSO 5%. Adicionar 10 μL a cada cavidade. Para controles negativos utilizar 10 μL de DMSO 5% isoladamente em cavidades.

2. Diluir 5 µL de solução de cdk2/ciclina A com 2,1 mL 2x a solução tampão de quinase.

3. Adicionar 20 µL de enzima a cada cavidade.

4. Adicionar 10 µL de EDTA 0,5 M às cavidades de controle negativo.

5. Para iniciar a reação de quinase, adicionar 20 µL de mistura de peptídeo/ATP a cada cavidade. Incubar durante 1 h sem agitação.

6. Adicionar 200 µL de solução de interrupção a cada cavidade.

7. Manter pelo menos 10 min.

8. Girar a placa a aproximadamente 2.300 rpm durante 3-5 min.

9. Contar as placas utilizando leitora Trilux ou similar.

TESTE DE TRANSFOSFORILAÇÃO DE MET

Este teste é utilizado para medir os níveis da fosfotirosina em um substrato de poli(ácido glutâmico:tirosina (4:1)) como um meio para identificar agonistas/antagonistas de transfosforilação de gst-IGF-1 de um substrato.

Materiais e Reagentes:

1. Placas ELISA Corning de 96 cavidades, Catálogo Corning # 25805-96.

2. Poli(Glu, Tir) (4:1), Catálogo Sigma # P0275.

3. PBS (Catálogo Gibco # 450-1300EB).

4. Hepes 50 mM.

5. Solução Tampão de Bloqueio: para 1 L, misturar 100 g de BSA, 12,1 g de TRIS (pH 7,5), 58,44 g de cloreto de sódio e 10 mL de TWEEN-20 1%.

6. Proteína de fusão GST purificada contendo o domínio de quinase, SUGEN, Inc.
7. Solução Tampão TBST:
8. DMSO aquoso 10% (H₂O MilliQue).
- 5 9. Adenosina-5'-trifosfato (dH₂O) aquoso 10 mM, Cat. Sigma No. A-5394.
- 10 10. 2X de Solução Tampão de Diluição de Quinase: para 100 mL, misturar 10 mL de Hepes 1 M a pH 7,5 com 0,4 mL de BSA/PBS 5%, 0,2 mL de ortovanato de sódio 0,1 M e 1 mL de cloreto de sódio 5 M em 88,4 mL de dH₂O.
11. 4x a mistura de reação de ATP: para 10 mL, misturar 0,4 mL de cloreto de manganês 1 M e 0,02 mL de ATP 0,1 M em 9,56 mL de dH₂O.
12. 4x de Mistura de Controles Negativos: para 10 mL, 15 misturar 0,4 mL de cloreto de manganês 1M em 9,6 mL de dH₂O.
13. Placas inferiores de polipropileno de 96 cavidades V NUNC, Catálogo Científico Aplicado #AS-72092.
14. EDTA 500 mM.
- 20 15. Solução Tampão de Diluição de Anticorpo: para 100 mL misturar 10 mL de BSA/PBS 5%, 0,5 mL de Leite® instantâneo Carnation 5% em PBS e 0,1 mL de ortovanadato de sódio 0,1 M em 88,4 mL de TBST.
16. Anticorpo anti-fosfotirosina policlonal de coelho 25 SUGEN, Inc.
17. Anticorpo conjugado de peroxidase IgG anti-coelho de cabra, Biosource, Inc.
18. Solução ABTS: para 1 L, misturar 19,21 g de ácido cítrico, 35,49 g de Na₂HPO₄ e 500 mg de ABTS com dH₂O 30 suficiente para fazer 1 L.

19. ABTS/H₂O₂: misturar 15 mL de solução de ABST com 2 µL de H₂O₂ 5 minutos antes da utilização.

20. HCl 0,2 M.

Procedimento:

- 5 1. Revestir as placas ELISA com 2 µg de poli(Glu, Tir) em 100 µL de PBS, armazenar durante a noite a 4°C.
2. Bloquear placa com 150 µL de BSA/PBS 5% durante 60 min.
3. Lavar a placa duas vezes com PBS, uma vez com de
10 de solução tampão de Hepes 50 mM pH 7,4.
4. Adicionar 50 µL da quinase diluída a todas as cavidades. A quinase purificada é diluída com Solução Tampão de Diluição de Quinase. A concentração final deve ser de 10 ng/cavidade.
- 15 5. Adicionar à placa 25 µL do composto de teste (em DMSO 4%) ou DMSO isoladamente (4% em dH₂O) para controles.
6. Incubar a mistura de quinase/composto durante 15 minutos.
7. Adicionar 25 µL de MnCl₂ 40 mM às cavidades de
20 controle negativo.
8. Adicionar 25 µL da mistura de ATP/MnCl₂ a todas as outras cavidades (exceto os controles negativos). Incubar durante 5 min.
9. Adicionar 25 µL de EDTA 500 mM para interromper a
25 reação.
10. Lavar placa 3x com TBST.
11. Adicionar 100 µL de anti-Ptyr policlonal de coelho diluído 1:10.000 em Solução Tampão de Diluição de Anticorpo a cada cavidade. Incubar, com agitação, durante 1
30 h a temperatura ambiente.

12. Lavar placa 3x com TBST.

13. Diluir anticorpo conjugado HRP de Biosource 1:6.000 em solução tampão de diluição de anticorpo. Adicionar 100 µL por cavidade e incubar a temperatura ambiente, com agitação, durante 1 hora.

14. Lavar placa 1x com PBS.

15. Adicionar 100 µL de solução de ABTS/H₂O₂ a cada cavidade.

16. Se necessário, interromper a reação de desenvolvimento adicionando 100 µL de HCl 0,2M por cavidade.

17. Ler resultados na Leitora ELISA Dynatech MR7000 com filtro de teste a 410 nm e filtro de referência a 630 nm.

15 **TESTE DE TRANSFOSFORILAÇÃO IGF-1**

Este teste é utilizado para medir o nível de fosfotirosina em poli(ácido glutâmico:tirosina (4:1)) para a identificação de agonistas/antagonistas de transfosforilação de gst-IGF-1 de um substrato.

20 Materiais e Reagentes:

1. Placas ELISA de 96 cavidades Corning.

2. Poli(Glu, Tir) (4:1), Cat. Sigma # PO275.

3. PBS, Catálogo Gibco # 450-1300EB.

4. Hepes 50 mM.

25 5. Solução Tampão de Bloqueio TBB: para 1 L, misturar 100 g de BSA, 12,1 g de Tris (pH 7,5), 58,44 g de cloreto de sódio e 10 mL de TWEEN-20 1%.

6. Proteína de fusão GST purificada que contém o domínio de quinase IGF-1 (SUGEN, Inc.).

7. Solução Tampão TBST: para 1 L, misturar 6,057 g de Tris, 8,766 g de cloreto de sódio e 0,5 mL de TWEEN-20 com dH₂O suficiente para formar 1 litro.

8. DMSO 4% em H₂O Milli-Q.

5 9. ATP 10 mM em dH₂O.

10 10. 2x Solução Tampão de Diluição de Quinase: para 100 mL, misturar 10 mL de HEPES 1 M (pH 7,5), 0,4 mL de BDA 5% em dH₂O, 0,2 mL M de ortovanadato de sódio 0,1 M e 1 mL de cloreto de sódio 5 M com dH₂O suficiente para formar 100 mL.

11. 4x Mistura de Reação ATP: para 10 mL, misturar 0,4 mL de MnCl₂ 1 M e 0,008 mL de ATP 0,01 M e 9,56 mL de dH₂O.

15 12. 4x Mistura de Controles Negativos: misturar 0,4 mL de cloreto de manganês 1 M em 9,60 mL de dH₂O.

13. Placas de fundo em V de polipropileno de 96 cavidades NUNC.

14. EDTA 500 mM em dH₂O.

20 15. Solução tampão de diluição de anticorpo: para 100 mL, misturar 10 mL de BSA 5% em , e 0,5 mL de Leite® sem Gordura Instantâneo Carnation 5% em PBS e 0,1 mL de ortovanadato de sódio 0,1 M em 88,4 mL de TBST.

16. Anticorpo de antifosfotirosina Policlonal de coelho, SUGEN, Inc.

25 17. Anticorpo conjugado HRP anti-coelho de cabra, Biosource.

18. Solução de ABTS.

19. ABTS/H₂O₂: misturar 15 mL de ABTS com 2 µL de H₂O₂ 5 minutos antes da utilização.

30 20. HCl 0,2 M em dH₂O.

Procedimento:

1. Revestir placa ELISA com 2,0 µg/cavidade de Poli(Glu, Tir) 4:1 (Sigma P0275) em 100 µL de PBS. Armazenar placa durante a noite a 4°C.
- 5 2. Lavar placa uma vez com PBS.
3. Adicionar 100 µL de Solução Tampão de Bloqueio de TBB a cada cavidade. Incubar a placa, com agitação, durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Lavar placa uma vez com PBS, em seguida duas vezes
10 com solução tampão de Hepes 50 mM pH 7,5.
5. Adicionar 25 µL do composto teste em DMSO 4% (obtido por diluição de uma solução de estoque de composto de teste 10 mM em DMSO 100% com dH₂O) à placa.
- 15 6. Adicionar 10,0 ng de quinase gst-IGF-1 em 50 µL de Solução Tampão de Diluição de Quinase a todas as cavidades.
7. Iniciar a reação de quinase pela adição de 25 µL de 4x Mistura de Reação ATP a todas as cavidades de
20 teste e cavidades de controle positivo. Adicionar 25 µL 4x de Mistura de Controles Negativos a todas as cavidades de controle negativo. Incubar durante 10 minutos com agitação a temperatura ambiente.
8. Adicionar 25 µL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) a todas as
25 cavidades.
9. Lavar placas 4x com Solução Tampão TBST.
10. Adicionar anti-soros de anti-fosfotirosina policlonais de coelho a uma diluição de 1:10.000 em 100 µL de Solução Tampão de Diluição de Anticorpo a

todas as cavidades. Incubar, com agitação, a temperatura ambiente durante 1 hora.

11. Lavar placa como na etapa 9.

5 12. Adicionar 100 µL de HRP anti-coelho Biosource a uma diluição de 1:10.000 em solução tampão de diluição de anticorpo a todas as cavidades. Incubar com agitação, a temperatura ambiente durante 1 hora.

13. Lavar placa como na etapa 9, seguido por uma lavagem com PBS para reduzir bolhas e Tween-20 em
10 excesso.

14. Desenvolver pela adição de 100 µL/cavidade de ABTS/H₂O₂ a cada cavidade.

15 15. Após aproximadamente 5 minutos, ler na leitora ELISA com teste de filtro a 410 nM e filtro de referência a 630 nM.

TESTES DE INCORPORAÇÃO BRDU

Os testes que se seguem utilizam células projetadas para expressar um receptor selecionado e em seguida avaliar o efeito de um composto importante sobre a atividade da
20 síntese de DNA induzida por ligand determinando a incorporação de BrdU no DNA.

Os materiais, reagentes e procedimento que se seguem são genéricos a cada um dos testes de incorporação de BrdU que se seguem. São observadas variações nos testes
25 específicos.

Materiais e Reagentes:

1. O ligante apropriado.
2. Células projetadas apropriadas.
3. Reagente de Rotulação BrdU: 10 mM, em PBS (pH 7,4)
30 (Boehringer Mannheim, Alemanha).

4. FixDenat: solução de fixação (pronta para utilização) (Boehringer Mannheim, Alemanha).
5. Anti-BrdU-POD: anticorpo monoclonal de camundongo conjugado com peroxidase (Boehringer Mannheim, Alemanha).
6. Solução de Substrato TMB: tetrametilbenzidina (TMB, Boehringer Mannheim, Alemanha).
7. Solução de Lavagem de PBS: 1x de PBS, pH 7,4.
8. Albumina, Bovina (BSA), pó V em fração (Sigma Chemical Co., USA).

Procedimento Genérico:

1. As células são semeadas a 8.000 células/cavidade em CS 15%, Gln 2 mM em DMEM, em uma placa de 96 cavidades. As células são incubadas durante a noite a 37°C em CO₂ 5%.
2. Após 24 horas, as células são lavadas com PBS e em seguida são livres de soro em meio isento de soro (CS 0% DMEM com BSA 0,1%) durante 24 horas.
3. No terceiro dia, o ligante apropriado e o composto do teste são adicionados simultaneamente às células. As cavidades de controle negativo recebem DMEM sem soro apenas com BSA 0,1%; as células de controle positivo recebem o ligante mas não recebem o composto do teste. Os compostos do teste são preparados em DMEM sem soro com ligante em uma placa de 96 cavidades e diluídos em série para concentrações de 7 testes.
4. Após 18 horas de ativação do ligante, é adicionado o reagente de rotulação BrdU diluído (1:100 em DMEM,

BSA 0,1%) e as células são incubadas com BrdU (concentração final = 10 μ M) durante 1,5 hora.

5 5. Após incubação com reagente de rotulação, o meio é removido decantando e batendo de leve a placa invertida sobre uma toalha de papel. É adicionada solução de FixDenat (50 μ L/cavidade) e as placas são incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos em um agitador de placa.

10 6. A solução de FixDenat é cuidadosamente removida decantando e batendo de leve a placa invertida sobre uma toalha de papel. É adicionado leite (leite desidratado 5% em PBS, 200 μ L/cavidade) como solução de bloqueio e a placa é incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente em um agitador de placa.

15 7. A solução de bloqueio é removida por decantação e as placas são lavadas uma vez com PBS. É adicionada solução anti-BrdU-POD (diluição de 1:200 em PBS, BSA 1%) (50 μ L/cavidade) e a placa é incubada durante 90 minutos a temperatura ambiente em um agitador de placa.

20 8. O conjugado de anticorpo é cuidadosamente removido decantando e enxaguando 5 vezes com PBS e a placa é seca invertendo e batendo de leve sobre uma toalha de papel.

25 9. É adicionada solução de substrato de TMB (100 μ L/cavidade) e incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente em um agitador de placa até que o desenvolvimento da cor seja suficiente para detecção fotométrica.

10. A absorção das amostras é medida a 410 nM (em um modo de "comprimento de onda duplo" com uma leitura de filtro a 490 nM, como comprimento de onda referencial) em uma leitora de placa ELISA Dynatech.

5 **Teste de Incorporação BrdU Induzido por EGF**

Materiais e Reagentes:

1. Camundongo EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japão).
2. 3T3/EGFRc7.

10 **Teste de Incorporação BrdU ativado por Her-2 Induzido por EGF**

Materiais e Reagentes:

1. Camundongo EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japão).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr com um domínio de quinase Her-2).

15 **Teste de Incorporação BrdU ativado por Her-4 Induzido por EGF**

Materiais e Reagentes:

1. Camundongo EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japão).
2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr (EGFr com um domínio de quinase Her-4).

20 **Teste de Incorporação BrdU Induzido por PDGF**

Materiais e Reagentes:

1. PDGF B/B humano (Boehringer Mannheim, Alemanha).
2. 3T3/EGFRc7.

25 **Teste de Incorporação BrdU Induzido por FGF**

Materiais e Reagentes:

1. FGF2/bFGF humano (Gibco BRL, USA).
2. 3T3c7/EGFr.

Teste de Incorporação BrdU Induzido por IGF1

30 Materiais e Reagentes:

1. Recombinante humano (G511, Promega Corp., USA).
2. 3T3/IGF1r.

Teste de Incorporação BrdU Induzido por Insulina Materiais e Reagentes:

- 5 1. Insulina, cristalina, bovina, zinco (13007, Gibco BRL, USA).
2. 3T3/H25.

Teste de Incorporação BrdU Induzido por HGF Materiais e Reagentes:

- 10 1. HGF recombinante humano (Cat. No. 249-HG, R&D Systems, Inc., USA).
2. Células BxPC-3 (ATCC CRL-1687).

 Procedimento:

- 15 1. As células são semeadas a 9.000 células/cavidade em RPMI FBS 10% em uma placa de 96 cavidades. As células são incubadas durante a noite a 37°C em CO2 5%.
2. Após 24 horas, as células são lavadas com PBS e em seguida são livres de soro em 100 µL de meio isento de soro (RPMI com BSA 0,1%) durante 24 horas.
- 20 3. No terceiro dia, 25 µL contendo ligante (preparado a 1 µg/mL em RPMI com BSA 0,1%; concentração de HGF final é de 200 ng/mL) e compostos do teste são adicionados às células. As cavidades de controle negativo recebem 25 µL de RPMI sem soro apenas com BSA 0,1%; as células de controle positivo recebem o ligante mas não recebem o composto do teste. Os compostos do teste são preparados a 5 vezes as suas concentrações finais em RPMI sem soro com ligante em
- 25
- 30 uma placa de 96 cavidades e diluídos em série para

concentrações de 7 testes. Tipicamente, a concentração final mais elevada do composto do teste é de 100 μM e são utilizadas diluições de 1:3 (isto é, a faixa de concentração do composto de teste é de 0,137-100 μM).

4. Após 18 horas de ativação do ligante, 12,5 μL de reagente de rotulação BrdU diluído (1:100 em RPMI, BSA 0,1%) são adicionados a cada cavidade e as células são incubadas com BrdU (concentração final é de 10 μM) durante 1 hora.

5. Igual ao Procedimento Genérico.

6. Igual ao Procedimento Genérico.

7. A solução de bloqueio é removida por decantação e as placas são lavadas uma vez com PBS. É adicionada solução anti-BrdU-POD (diluição de 1:100 em PBS, BSA 1%) (100 μL /cavidade) e a placa é incubada durante 90 minutos a temperatura ambiente em um agitador de placa.

8. Igual ao Procedimento Genérico.

9. Igual ao Procedimento Genérico.

10. Igual ao Procedimento Genérico.

Teste HUV-EC-C

Este teste é utilizado para medir a atividade do composto contra PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF ou Flk-1/KDR, todos eles são naturalmente expressos por células HUV-EC.

DAY 0

1. Lavar e tripsinizar células HUV-EC-C (células endoteliais da veia umbilical humana, (American Type Culture Collection, Catálogo no. 1730 CRL). Lavar com salina de solução tampão de fosfato da Dulbecco (D-PBS,

obtido na Gibco BRL, Catálogo no. 14190-029) 2 vezes a
aproximadamente 1 mL/10 cm² o recipiente de cultura do
tecido. Tripsinizar com tripsina-EDTA 0,05% em solução de
dissociação de célula não-enzimática (Sigma Chemical
5 Company, Catálogo no. C-1544). A tripsina 0,05% é produzida
diluindo tripsina 0,25%/EDTA 1 mM (Gibco, Catálogo no.
25200-049) na solução de dissociação de célula. Tripsinizar
com aproximadamente 1 mL/25-30 cm² do recipiente de cultura
do tecido durante aproximadamente 5 minutos a 37°C. Depois
10 que as células se separaram do recipiente, adicionar um
volume igual de meio de teste e transferir para um tubo de
centrifugação esterilizado de 50 mL (Fisher Scientific,
Catálogo no. 05-539-6).

2. Lavar as células com aproximadamente 35 mL do meio
15 de teste no tubo de centrifugação esterilizado de 50 mL
adicionando o meio de teste, centrifugar durante 10 minutos
a aproximadamente 200 x g, aspirar o sobrenadante e
suspender novamente com 35 mL de D-PBS. Repetir a lavagem
duas vezes mais com D-PBS, suspender novamente as células
20 em aproximadamente 1 mL de meio de teste/15 cm² de
recipiente de cultura de tecido. O meio de teste consiste
em meio F12K (Gibco BRL, Catálogo no. 21127-014) e soro
bovino fetal 0,5% inativado termicamente. Contar as células
com um Coulter Counter® (Coulter Electronics, Inc.) e
25 adicionar às células o meio de teste para obter uma
concentração de 0,8-1,0 x 10⁵ células/mL.

3. Adicionar células às placas de fundo plano de 96
cavidades a 100 µL/cavidade ou 0,8-1,0 x 10⁴
células/cavidade, incubar ~ 24 h a 37°C, CO₂ 5%.

30 DIA 1

1. Compor titulações do composto do teste duas vezes em placas separadas de 96 cavidades, geralmente de 50 μM a 0 μM . Utilizar o mesmo meio do teste que mencionado no dia 0, etapa 2 acima. As titulações são feitas mediante adição
5 de 90 μL /cavidade do composto do teste a 200 μM (4x a concentração final das cavidades) à cavidade superior de uma coluna de placas específica. Uma vez que o composto do teste armazenado é normalmente DMSO 20 mM, a concentração de 200 μM da droga contém DMSO 2%.

10 Um diluente composto até DMSO 2% em meio do teste (F12K + soro bovino fetal 0,5%) é utilizado como diluente para as titulações do composto do teste a fim de diluir o composto do teste mas manter constante a concentração de DMSO. Adicionar este diluente às placas remanescentes na
15 coluna a 60 μL /cavidade. Retirar 60 μL dos 120 μL da diluição do composto de teste de 200 μM na cavidade superior da coluna e misturar com os 60 μL na segunda cavidade da coluna. Retirar 60 μL desta cavidade e misturar com os 60 μL na terceira cavidade da coluna e assim por
20 diante até que as titulações repetidas duas vezes estejam completas. Quando a penúltima cavidade for misturada, retirar 60 μL dos 120 μL nesta cavidade e descartar a mesma. Deixar na última cavidade 60 μL de diluente de DMSO/meios como um controle que não contém o composto do
25 teste. Formar 9 colunas do composto do teste titulado, suficientes para triplicar cavidades cada uma delas para:
(1) VEGF (obtido na Pepro Tech Inc., Catálogo no. 100-200),
(2) fator de desenvolvimento de células endoteliais (ECGF) (também conhecido como fator de desenvolvimento de
30 fibroblasto ácido ou aFGF) (obtido na Boehringer Mannheim

Biochemica, Catálogo no. 1439 6000), ou, (3) PDGF B/B humano (1276-956, Boehringer Mannheim, Alemanha) e controle dos meios do teste. O ECGF vem como uma preparação com heparina de sódio.

5 2. Transferir 50 µL/cavidade das diluições do composto do teste para as placas de teste de 96 cavidades que contêm $0,8-1,0 \times 10^4$ células/100 µL/cavidade das células HUV-EC-C do dia 0 e incubar ~ 2 h a 37°C, CO₂ 5%.

3. Em triplicado, adicionar 50 µL/cavidade de 80
10 µg/mL de VEGF, 20 ng/mL de ECGF ou controle dos meios a cada condição do composto do teste. Como no caso dos compostos do teste, as concentrações do fator de desenvolvimento são 4X a concentração final desejada. Utilizar os meios do teste do dia 0, etapa 2, para formar
15 as concentrações dos fatores de desenvolvimento. Incubar aproximadamente 24 horas a 37°C, CO₂ 5%. Cada cavidade terá 50 µL da diluição do composto do teste, 50 µL do fator ou meios de desenvolvimento e 100 µL de células, o que dá um total de 200 µL/cavidade. Sendo assim, as concentrações de
20 4X do composto do teste e os fatores de desenvolvimento tornam-se 1X logo que tudo tenha sido adicionado às cavidades.

DIA 2

1. Adicionar ³H-timidina (Amersham, catálogo no. TRK-
25 686) em 1 µCi/cavidade (10 µL/cavidade de 100 µCi/mL da solução formada em meio RPMI + soro bovino fetal 10% termicamente inativado) e incubar ~ 24 h a 37°C, CO₂ 5%. RPMI é obtido na Gibco BRL, catálogo no. 11875-051.

DIA 3

30 1. Congelar as placas durante a noite a -20°C.

DIA 4

Descongelar as placas e colher com uma colheitadeira de placas de 96 cavidades (Colheitadeira Tomtec 96®) sobre telas de filtro (Wallac, catálogo no. 1205-401), ler as
5 contagens em um contador de cintilações de líquido Wallac Betaplate™.

A Tabela 3 mostra os resultados dos testes biológicos de alguns compostos exemplificativos desta invenção. Os resultados são indicados em termos de IC₅₀, sendo a
10 concentração micromolar (μM) do composto testada o que provoca uma alteração de 50% na atividade da PKT alvo comparada com a atividade da PKT em um controle ao qual não se adicionou o composto do teste. Especificamente, os resultados mostrados indicam a concentração de um composto
15 do teste necessária para provocar uma redução de 50% da atividade da PTK alvo. Os biotestes que foram ou podem ser utilizados para avaliar os compostos são descritos detalhadamente abaixo.

20

TABELA 3

Exemplo	bio flkGST IC50 (μM)	bio FGFR1 IC50 (μM)	bio PDGF IC50 (μM)	bio EGF IC50 (μM)	célula EGF IC50 (μM)	Her2 Quinase IC50 (μM)	cdk2spa C50 (μM)	bio pyk2 IC50 (μM)
1	57.68	15.16	>100	>100	>100			>100
2	>100		>100	>100	>100			
3	9.85	9.62	>100	>100	>100			>100
4	3.57	>20	>100	>100	>100	>100		
5	8.3	16.06	>100	>100	>100	>100		

Exemplo	bio flkGST IC50 (μ M)	bio FGFR1 IC50 (μ M)	bio PDGF IC50 (μ M)	bio EGF IC50 (μ M)	célula EGF IC50 (μ M)	Her2 cinase IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	bio pyk2 IC50 (μ M)
6	4.04		>100	3.26	7.82	2.43		
7	7.74		>100	5.07	9.8	4.24		
8	12.1		>100	51.34	20.08	5.5		
9	0.96		>100	>100	>100	16.38		
10	5.72		>100	94.04	15.86	8.06		
11	9.77		>100	>100	>100	>100		
12	>20		21.46	>100		27.73		
13	>20		81.92	8.17		2.66		
14	13.01		42.41	>100		66.02		
15	>20		>100	>100		98.61		
16	>20		98.06	>100		23.32		
17	8.25	2.47	94.35	0.83	11.47	15.94	>10	
18	2.67			2.57	9.23	4.99		
19	7.5			6.86	34.18	8.37		
20	11.53			>100	41.16	8		
21	7.18		>100	40.34		27.69		
22	>20		>100	>100		87.67		
23	>20		>100	36.64		4.05		
24			>100	16.84		5.31		
25	12.55		>100	23.48		7.9		
26	16.03		66.87	34.67		10.04		
27			>100	26.5		3.91		
28	4.5		71.27	53.66		2.67		
29	10.12		>100	26.72		3.98		
30	9.4		>100	18.69		4.1		
31	>50		>100	9.83		47.19		

Exemplo	bio flkGST IC50 (μ M)	bio FGFR1 IC50 (μ M)	bio PDGF IC50 (μ M)	bio EGF IC50 (μ M)	célula EGF IC50 (μ M)	Her2 cinase IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	bio pyk2 IC50 (μ M)
32	45.74		5.94	>100		>100		
34	>50		>100	>100		>100		
35	>20		>100	80.4		54.14		
36	>20		>100	>100		>100		
37	0.22		3.06	10.78	9.84	1.4		
38	4.17		3.06	6.04	8.97	2.16		
39	3.38		4.69	3.67	14.54	3.53		
40	4.5		7.9	6.52		6.27		
42	0.1		0.12	11.95	74.55	20.43		
43	1.12		8.38	>100	37.33	53.37		
44	<0.05		0.02	20.73	67.46	6.99		
45	1.71		>100	>100	29.95	>100		
46	30.62		6.18	>100	>100	>100		
47	0.08	1.56	0.06	11.42	41.54	8.4	>20	1.05
48	0.006	0.3	<0.78	17.88	21.58	7.93		0.09
49			<0.78	>100	43.86	>100		
50			<0.78	>100	20.34	>100		
51	0.006	1.66	0.01	18.1	21.61	23.24	16.69	0.35
52	0.08	1.26	<0.78	12.53	>100	>100	10.66	0.45
53			<0.78	>100	>100	>100		
54	1.98		<0.78	23.88	9.76	7.02		
55	0.27		0.53	6.03	35.99	77.82		
56	2.32		3.19	>100	10.03	7.11		
57	0.06		7.98	>100	9.97	6.94		
58			21.14	>100	>100	>100		
59			<0.78	>100	>100	>100		

Exemplo	bio flkGST IC50 (μ M)	bio FGFR1 IC50 (μ M)	bio PDGF IC50 (μ M)	bio EGF IC50 (μ M)	célula EGF IC50 (μ M)	Her2 cinase IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	bio pyk2 IC50 (μ M)
60			<0.78	>100	>100	>100		
61			<0.78	>100	>100	>100		
62	8.00		8.32	>100	>100	>100		
63	0.21		<0.78	8.59	>100	>100		
64	0.55		<0.78	30.49	>100	>100		
65	0.37		<0.05	>100	74.36	15.97		
66	<0.05			>100	11.84	2.76		
67	0.39		24.77	31.38	19.79	2.56		
68	1.16		0.03	>100	23.52	34.13		
69	0.3		56.55	>100	97.54	>100		
70	0.09	1.50	0.0030	10.57	6.42	7.99	12.62	0.63
71	15.21		22.5	>100		9.91		
72	6.06		10.54	>100	39.94	9.65		
73	5.95		14.12	>100	39.5	8.59		
74	1.2		0.09	46.75		>100		
75	2.7		61.55	>100		>100		
76	3.33		19.18	5.11		3.01		
77	0.49		25.01	>100		>100		
78	1.94		70.62	9.33		4.25		
79	1.49		>100	27.39		>100		
80	0.13	4.29	0.001	>100		50.19	17.19	0.28
81	0.21		0.18	>100		>100		
82	2.03	7.69	6.88	>100		>100		0.31
83	0.34	0.41	9.46	2.18		86.9		0.008
84	1.38		12.51	67.2		5.86		0.006
85	0.2	0.8	2.59	>100		3.76		

Exemplo	bio flkGST IC50 (μ M)	bio FGFR1 IC50 (μ M)	bio PDGF IC50 (μ M)	bio EGF IC50 (μ M)	célula EGF IC50 (μ M)	Her2 cinase IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	bio pyk2 IC50 (μ M)
86	1.45	1.3	19.6	41.8		>100		3.58
87	3.27	7.56	6.46	>100		9.1		0.17
88	0.35	1.18	8.06	2.36		>100		0.09
89	7.84		47.58	8.53	9.67	15.97		
115	7.3		7.48	>100		>100	0.006	
116	>20		>100	>100		>100	<0.0005	
117	0.91		12.9	>100		>100	0.006	
118	1.93		1.2	>100		>100	0.002	
119	1.38		61.63	>100		>100	<0.0005	

MODELOS ANIMAIS IN VIVO

MODELOS ANIMAIS XENOENXERTADOS

A capacidade que tumores humanos possuem para se desenvolverem como xenoenxertos em camundongos atímicos (por exemplo, Balb/c, nu/nu) propicia um modelo *in vivo* útil para o estudo da resposta biológica a terapias para tumores humanos. Desde o primeiro xenotransplante bem sucedido de tumores humanos em camundongos atímicos, (Acta Pathol. Microbial. Scand. 77:758-760 de Rygaard e Povlsen, 1969), muitas linhas de células de tumores humanos diferentes (por exemplo, mamário, pulmonar, genitourinário, gastrointestinal, cabeça e pescoço, glioblastoma, osso e melanomas malignos) foram transplantados e desenvolvidos com êxito em camundongos desguarnecidos. Os testes que se seguem podem ser utilizados para determinar o nível de atividade, especificidade e efeito dos diferentes compostos da presente invenção. Três tipos genéricos de testes são

úteis na avaliação de compostos: celular/catalítico, celular/biológico e *in vivo*. O objetivo dos testes celular/catalítico é determinar o efeito de um composto sobre a capacidade de uma TK para fosforilatar tirosinas em um substrato conhecido em uma célula. O objetivo dos testes celular/biológico é determinar o efeito de um composto sobre a resposta biológica estimulada por uma TK em uma célula. O objetivo dos testes *in vivo* é determinar o efeito de um composto em um modelo animal em uma enfermidade específica tal como o câncer.

Linhas de células adequadas para experimentos com xenoenxerto subcutâneos incluem células C6 (glioma, ATCC # CCL 107), células A375 (melanoma, ATCC # CRL 1619), células A431 (carcinoma epidermóide, ATCC # CRL 1555), células Calu 6 (pulmão, ATCC # HTB 56), células PC3 (prostato, ATCC # CRL 1435), células SKOV3TP5 e fibroblastos NIH 3T3 geneticamente programados para superexpressar EGFR, PDGFR, IGF-1R ou qualquer outra quinase de teste. O protocolo que se segue pode ser utilizado para realizar experimentos com xenoenxertos:

Os camundongos atímicos fêmea (BALB/c, nu/nu) são obtidos na Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). Todos os animais são mantidos sob condições higiênicas em jaulas Micro-isoladoras com revestimento Alfa-dri. Os mesmos recebem ração para roedores esterilizada e água a vontade.

As linhas de células são desenvolvidas em meio apropriado (por exemplo, MEM, DMEM, F10 de Ham, ou F12 de Ham mais 5%-10% de soro bovino fetal (FBS) e glutamina (GLM) 2mM). Todos os meios de cultura de células, a glutamina e o soro bovino fetal são adquiridos na Gibco

Life Technologies (Grand Island, NY) a não ser que especificado em contrário. Todas as células são desenvolvidas em uma atmosfera úmida de 90-95% de ar e 5-10% de CO₂ a 37°C. Todas as linhas de células são
5 rotineiramente subcultivadas duas vezes por semana e são negativas para micoplasma como determinado pelo método Mycotect (Gibco).

As células são colhidas na confluência ou próximo da mesma com Tripsina-EDTA 0,05% e granuladas a 450 x g
10 durante 10 min. Os grãos são novamente suspensos em PBS ou meios esterilizados (sem FBS) até uma concentração específica e as células são implantadas no flanco posterior do camundongo (8-10 camundongos por grupo, 2-10 x 10⁶ células/animal). O desenvolvimento do tumor é medido
15 durante 3 a 6 semanas utilizando paquímetros Vernier. Os volumes dos tumores são calculados como um produto de comprimento x largura x altura a não ser que indicado de outro modo. Os valores P são calculados utilizando o teste Student t. Os compostos de teste em 50-100 µL (DMSO, ou
20 VPD:D5W) podem ser fornecidos por injeção IP com diferentes concentrações começando geralmente no dia 1 após implantação.

MODELO DE INVASÃO DO TUMOR

O modelo de invasão do tumor a seguir foi
25 desenvolvido e pode ser usado para a estimativa do valor terapêutico e eficácia dos componentes identificados para inibir seletivamente o receptor de KDR/FLK-1.

Procedimento

Camundongos de 8 semanas de idade (fêmeas) (Simonsen
30 Inc.) são usados como animais experimentais. A implantação

de células tumorais pode ser realizada em coifa de escoamento laminar. Para anestesia, são administrados de modo intraperitoneal Coquetel de Xilasina/Cetamina (100 mg/kg de cetamina e 5 mg/kg de xilasina). Uma incisão central é feita para expor a cavidade abdominal (aproximadamente 1,5 cm em comprimento) para injetar 10^7 células tumorais em um volume de 100 μ L de meio. As células são injetadas no lóbulo duodenal do pâncreas ou sob a serosa do cólon. O peritônio e os músculos são fechados com uma sutura contínua de seda 6-0 e a pele é fechada mediante o uso de grampos para ferimentos. Os animais são observados diariamente.

Análise

Após 2-6 semanas, dependendo das observações grosseiras dos animais, os camundongos são sacrificados e as metástases do tumor local em diversos órgãos (pulmão, fígado, cérebro, estômago, baço, coração, músculo) são estirpadas e analisadas (medição do tamanho do tumor, grau de invasão, imunquímica, determinação de hibridização in situ, etc.).

TESTE C-KIT

Este teste é utilizado para detectar o nível de fosforilação da tirosina c-kit.

Células MO7E (leucemia mielóide aguda humana) foram privadas de soro durante a noite em soro 0,1%. As células foram pré-tratadas com o composto (concorrente com a privação do soro), antes da estimulação do ligante. As células foram estimuladas com 250 ng/mL de rh-SCF durante 15 minutos. Após estimulação, as células foram lisadas e imunoprecipitadas com um anticorpo anti-c-kit. Os níveis da

fosfotirosina e proteína foram determinados por absorção com mata-borrão Western.

TESTE DE PROLIFERAÇÃO DE MTT

Células MO7E foram privadas de soro e pré-tratadas com o composto como descrito nos experimentos de fosforilação. As células foram dispostas @ 4×10^5 células/cavidade em uma placa de 96 cavidades, em 100 μ L de RPMI + soro 10%. Foi adicionado rh-SCF (100 ng/mL) e a placa foi incubada durante 48 horas. Após 48 horas, adicionou-se 10 μ L de MTT 5 ng/mL [3-(4,5-dimetiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio brometo) e permitiu-se que incubasse durante 4 horas. Foi adicionado isopropanol ácido (100 μ L de HCl 0,04 N em isopropanol) e a densidade ótica foi medida a um comprimento de onda de 550 nm.

TESTE DE APOPTOSIS

Células MO7E foram incubadas +/- SCF e +/- composto em FBS 10% com rh-GM-CSF (10 ng/mL) e rh-IL-3 (10 ng/mL). As amostras foram testadas a 24 e 48 horas. Para medir caspase-3 ativada, as amostras foram lavadas com PBS permeabilizadas com etanol 70% esfriado em gelo. Em seguida as células foram manchadas com caspase-3 anti-ativo de coelho policlonal conjugado com PE e analisado por FACS. Para medir PARP clivado, as amostras foram lisadas e analisadas por absorção com papel higiênico Western com um anticorpo anti-PARP.

Testes Adicionais

Testes adicionais que podem ser utilizados para avaliar os compostos desta invenção incluem, sem limitação, um teste bio-flk-1, um teste de receptor quimérico EGF receptor-HER2 em células completas, um teste bio-src, um

teste bio-lck e um teste que mede a função de fosforilação de raf. Os protocolos para cada um destes testes podem ser encontrados no Pedido de Patente U.S. No. de Série 09/099.842, que está incorporado aqui mediante referência, incluindo quaisquer desenhos.

Medição de Toxicidade das Células

Os compostos terapêuticos devem ser mais potentes na inibição da atividade de tirosina quinase do receptor do que na aplicação de um efeito citotóxico. Uma medida da eficácia e da toxicidade das células de um composto pode ser obtida determinando o índice terapêutico, isto é, IC_{50}/LD_{50} . IC_{50} , a dose requerida para obter 50% de inibição, pode ser medida utilizando técnicas padrão tais como aquelas descritas aqui. LD_{50} , a dosagem que resulta em 50% de toxicidade, também pode ser medida por técnicas padrão (J. Immunol. Methods, 65:55-63 de Mossman, 1983), medindo a quantidade de LDH liberada (J. Immunol. Methods, 64:313 de Korzeniewski e Callewaert, 1983, J. Immunol. Methods, 115:61 de Decker e Lohmann-Matthes, 1988), ou medindo a dose letal em modelos animais. Os compostos com um índice terapêutico grande são preferidos. O índice terapêutico deveria ser maior que 2, de preferência pelo menos 10, mais preferivelmente pelo menos 50.

B. Exemplo de Resultados de Testes Celulares que Utilizam (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

Para confirmar a potência de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto

80) detectada em testes bioquímicos (*vide infra*), a capacidade do referido composto na inibição da fosforilação de RTK dependente de ligante foi avaliada em testes à base de células que utilizam células de camundongos NIH-3T3 projetadas para superexpressar Flk-1 ou PDGFR β humano. (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) inibiu a fosforilação da tirosina Flk-1 dependente de VEGF com um valor de IC₅₀ de aproximadamente 0,03 μ M. Este valor é similar ao valor 0,009 μ M K_i determinado para a inibição de Flk-1 por (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) determinado nos testes bioquímicos. Isto indica que (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) penetra imediatamente nas células. Consistente com os dados bioquímicos (*vide infra*) que indicam que (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) tinha atividade comparável contra Flk-1 e PDGFR β , verificou-se também que a mesma inibiu a fosforilação do receptor dependente de PDGF em células com um valor IC₅₀ de aproximadamente 0,03 μ M. A capacidade de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) para inibir c-kit, uma RTK intimamente associada que aglutina o fator de célula tronco (SCF), foi determinada utilizando células MO7E que expressam este receptor. Nestas

células, (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) inibiu a fosforilação de c-kit dependente de SCF com um valor de IC_{50} de 0,01-0,1 μM . Este composto também inibiu a fosforilação de c-kit estimulada por SCF nos blastos da leucemia mielóide aguda (AML) isolados a partir do sangue periférico de pacientes.

Além de testar a capacidade de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) para inibir a fosforilação do receptor dependente do ligante em células, o seu efeito sobre a resposta proliferativa dependente do ligante de células também foi examinada *in vitro* (vide Tabela 4). Nestes estudos, células imobilizadas por privação de soro durante a noite foram induzidas a submeter-se à síntese de DNA após adição do ligante mitogênico apropriado. Como mostrado na Tabela 4, (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) inibiu a proliferação induzida por PDGF de células NIH-3T3 que superexpressam PDGFR β ou PDGFR α com valores de IC_{50} de 0,031 e 0,069 μM , respectivamente, e a proliferação induzida por SCF de células MO7E com um valor de IC_{50} de 0,007 μM .

25 TABELA 4

	Bioquímico	IC_{50} Celular	
	K_i^1 (μM)	Fosforilação de Receptor (μM)	Proliferação dependente de ligante (μM)
Recept or			

Flk-1/KDR	0,009	0,03 ²	0,004 ³
PDGFR α	0,008	0,03 ⁴	0,031 ⁴
PDGFR β	ND	ND	0,069 ⁵
FGFR	0,83	ND	0,7 ³
c-kit	ND	0,01-0,1 ⁶	0,007 ⁶
ND = Não Determinado ¹ Determinado mediante utilização de enzima recombinante ² Determinado mediante utilização de células NIH-3T3 privadas de soro que expressam Flk-1 ³ Determinado mediante utilização de HUVECs privadas de soro ⁴ Determinado mediante utilização de células NIH-3T3 privadas de soro que expressam PDGFR α ⁵ Determinado mediante utilização de células NIH-3T3 privadas de soro que expressam PDGFR β ⁶ Determinado mediante utilização de células MO7E privadas de soro			

Como mostrado na Tabela 4, existe um acordo genérico entre as atividades bioquímica e celular de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) que sustenta a conclusão de que este composto atravessa membranas celulares. Além disso, pode-se concluir que as respostas celulares são um resultado da atividade do composto 80 contra o alvo indicado. Em contrapartida, quando testadas na presença do meio de desenvolvimento completo *in vitro*, foram necessárias concentrações substancialmente mais elevadas de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-

ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) ($> 10 \mu\text{M}$) para inibir o desenvolvimento de diversas células tumorais em seres humanos (vide Tabela 5). Isto indica que o composto não inibiu diretamente o desenvolvimento destas células a concentrações necessárias para inibir a fosforilação do receptor dependente do ligante e a proliferação de células.

TABELA 5

Linha da Célula	Origem	IC ₅₀ (μM)	LD ₅₀ (μM)
HT29	Carcinoma do cólon	10	22
A549	Carcinoma do pulmão	9,5	22
NCI-H460	Carcinoma do pulmão NSC	8,9	20
SF767T	Glioma	7,9	14
A431	Carcinoma epidermóide	6,0	18

Resumidamente, os resultados mostrados na Tabela 5 foram obtidos por incubação de células durante 48 h em meio de desenvolvimento completo na presença de diluições em série de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico. No final do período de desenvolvimento, determinou-se o número relativo de células. Os valores IC₅₀ foram calculados como a concentração do composto que inibiu o desenvolvimento de células em 50% em relação a células não tratadas. Os valores LD₅₀ foram calculados como a concentração do composto que provocou uma redução de 50% no

número de células em relação àsquelas do início do experimento.

Um teste baseado em células mais relevante para avaliar o potencial anti-angiogênico de (2-dietilamino-
5 etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) é o teste de mitogênese *in vitro* que utiliza células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) como um sistema modelo para a proliferação de células endoteliais
10 importantes para o processo angiogênico. Neste teste, uma resposta mitogênica, medida como um aumento da síntese de DNA, é induzida em HUVECs privadas de soro após adição de VEGF ou FGF. Nestas células, (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-
15 2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) inibiu a resposta mitogênica induzida por VEGF e FGF em um modo dependente da dosagem com valores de IC₅₀ de 0,004 µM e 0,7 µM, respectivamente, quando o composto estava presente durante o teste de 48 h.

20 Resumidamente, os testes mencionados acima foram obtidos utilizando HUVECs privadas de soro que foram incubadas com concentrações mitogênicas de VEGF (100 ng/mL) ou FGF (30 ng/mL) na presença de diluições em série de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-
25 diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) durante 24 h. A resposta mitogênica durante as 24 h seguintes na presença de ligante e inibidor foi quantificada através da medição da síntese de DNA com base na incorporação da bromodeoxiuridina no DNA
30 celular.

Em experimentos separados, o composto 80 inibiu a fosforilação dependente de VEGF de ERK 1/2 (quinase de p42/44MAP), um alvo anteriormente a jusante de Flk-1/KDR, em um modo dependente de dosagem. A atividade inibidora do
5 composto 80 também demonstrou ser duradoura neste sistema; inibindo a fosforilação dependente de VEGF de ERK 1/2 por um período de 48 horas após remoção de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto
10 80) do meio após uma exposição curta (2 h) a concentrações micromolares do composto.

Reconheceu-se que o VEGF é um fator de sobrevivência importante para células endoteliais. Uma vez que (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-
15 carboxílico (Composto 80) inibe a resposta mitogênica dependente de VEGF das HUVECs, o efeito do composto sobre a sobrevivência da HUVEC foi investigado. Nestes experimentos, foi utilizada clivagem da polimerase de poli-ADP-ribocila do substrato de caspase 3 como uma leitura para apoptose.
20 As HUVECs cultivadas em condições isentas de soro durante 24 horas apresentaram níveis substanciais de clivagem de PARP, conforme detectado pelo acúmulo do fragmento de clivagem 23 Kda PARP. Isto foi amplamente impedido pela
25 adição de VEGF ao meio de células, indicando que VEGF atua como um fator de sobrevivência neste teste. A (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) demonstrou inibir a sinalização de KDR.
30 Conseqüentemente, (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-

fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) inibiu a sobrevivência da HUVEC mediada por VEGF em um modo dependente de dosagem. Sendo assim, estes dados indicam que o composto 80 induziu a apoptose em células endoteliais em cultura na presença de VEGF.

C. Estudos sobre Eficácia *in vivo*

i. Eficácia contra Xenoenxertos Tumoriais Estabelecidos

A eficácia *in vivo* de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) foi estudada em modelos de xenoenxertos (SC) subcutâneos utilizando células de tumores humanos implantadas na região do flanco posterior de camundongos atímicos. Após implantação, permitiu-se que os tumores atingissem um tamanho de 100-550 mm³ antes do início do tratamento oral como composto.

A administração oral diária do composto 80 provocou uma inibição dependente da dosagem de crescimento do tumor A431 quando o tratamento foi iniciado após os tumores terem crescido até um tamanho de 400 mm³. Inibição estatisticamente significativa ($P < 0,05$) de crescimento do tumor foi verificada com dosagens de 40 mg/kg/dia (74% de inibição) e 80 mg/kg/dia (84% de inibição) (vide Tabela 6). Em experimentos preliminares, uma dosagem mais elevada (160 mg/kg/dia) do composto não foi mais eficaz contra tumores A431 estabelecidos do que a dosagem 80 mg/kg/dia. Além disso, camundongos tratados com dosagem de 160 mg/kg/dia do composto perderam peso corporal, indicando que a dosagem

mais elevada não foi bem tolerada. Foram obtidos resultados similares em um experimento em que se permitiu que tumores A431 atingissem apenas 100 mm³ em tamanho (vide Tabela 5). Neste segundo experimento, a regressão completa dos tumores ocorreu em seis dos oito animais tratados com 80 mg/kg/dia durante 21 dias. Nestes seis animais, os tumores não voltaram a crescer durante o período de observação de 110 dias após o término do tratamento. Nos dois animais em que os tumores voltaram a aumentar até um tamanho (2000-3000 mm³) os tumores regrediram em resposta a uma segunda série de tratamento com o composto 80. É importante o fato de que, em todos os experimentos sobre eficácia, a (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) em 80 mg/kg/dia foi bem tolerada, mesmo em doses contínuas durante mais de 100 dias.

TABELA 6

Volume Inicial do Tumor (mm ³)	Composto ¹ (mg/kg/dia)	% Inibição (dia)	Valor-P
400	80	84 (36)	0,001
	40	74 (36)	0,003
	20	51 (36)	0,130
100	80	93 (40)	0,002
	40	75 (40)	0,015
	10	61 (40)	0,059

¹ Compound 80.

Resumidamente, os resultados mostrados na Tabela 6 foram obtidos utilizando células A431 (0,5 x 10⁶ células/camundongo) que tiveram CS implantadas na região do

flanco posterior de camundongos atímicos. A administração oral diária de (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) em um veículo ou
5 controle de veículo à base de cremofore foi iniciada quando os tumores atingiram o volume médio indicado. Os tumores foram medidos utilizando paquímetros Vernier e o volume do tumor foi calculado como o produto de comprimento x largura x altura. Os valores P foram calculados mediante comparação
10 do tamanho dos tumores para animais que foram tratados com o composto 80 (n = 8) com aqueles de animais que foram tratados com um veículo (n = 16) no último dia do experimento, utilizando o teste t de Student de duas caudas.

15 O composto sobre eficácia 80 contra tumores humanos estabelecidos de diferentes origens foi determinado utilizando Colo205 (carcinoma do cólon), SF763T (glioma) e NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células não pequenas) xenoenxertos (vide Tabela 7). Estes experimentos foram
20 realizados utilizando (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) administrada oralmente a 80 mg/kg/dia; uma dose que foi eficaz e bem tolerada.

25 **TABELA 7**

	Tipo de Tumor	Volume Inicial do Tumor (mm ³)	% Inibição (dia)	Valor-P
A431 ¹	Epidermóide	100	93 (40)	0,002
A431 ¹	Epidermóide	400	84 (36)	0,001
Colo205	Cólon	370	77 (54)	0,028
NCI-H460	Pulmão	300	61 (54)	0,003
SF763T	Glioma	550	53 (30)	0,001
¹ Os dados são para os testes registrados na Tabela 5.				

Nos experimentos mencionados acima, o composto 80 foi administrado uma vez ao dia a 80 mg/kg em um veículo à base de Cremofore logo que os tumores atingiram o tamanho indicado. A percentagem de inibição comparada com o grupo de controle tratado com o veículo foi calculada no final dos experimentos. Valores de P foram calculados comparando tamanhos de tumor dos animais que tinham sido tratados com o composto com tamanhos de tumor daqueles animais que tinham sido tratados com o veículo, utilizando o teste t de Student de duas caudas.

Embora a (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (Composto 80) inibisse o desenvolvimento de todos os tipos de tumores mostrados na Tabela 7, houve uma diferença na resposta dos diferentes modelos de xenoenxertos. Especificamente, o desenvolvimento de tumores NCI-H460 e SF763T foi detido ou muito reduzido enquanto que os tumores Colo205, como os tumores A431, regrediram quando tratados com (2-dietilamino-etil) amida

de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

A fim de determinar a base molecular para a diferença em resposta entre modelos de xenoenxertos, foram estudados os tumores SF763T. Por conseguinte, os tumores SF763T, que foram menos responsivos ao tratamento com (2-dietilamino-etil) amida de ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-diidroindol-3-ilidenometil)-2,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico, foram avaliados ao nível molecular utilizando técnicas imuno-histológicas para determinar o efeito do tratamento com o composto. Estes estudos foram inicialmente realizados neste tipo de tumor uma vez que os tumores SF763T são altamente vascularizados com microvasos que expressam fortemente o marcador de células endoteliais CD31 e são conseqüentemente bem adequados para estudos da densidade de microvasos tumorais (MVD). A avaliação imuno-histológica dos tumores SF763T indicou que tumores de animais tratados apresentaram MVD reduzido em relação aos controles tratados com veículo, consistentes com um mecanismo anti-angiogênico de ação para o composto 80; a MVD foi de $24,2 \pm 4,1$ em animais tratados com o composto 80, em comparação com $39,3 \pm 5,7$ para aqueles que foram tratados com o veículo apenas. Como esperado a partir da parada de desenvolvimento tumoral associada, foi evidente uma inibição pronunciada da proliferação de células tumorais em tumores que foram tratados com o composto 80. Estes tumores tinham metade do índice mitótico daquele em tumores tratados com veículo (dados não mostrados). O composto eficaz 80 sobre MVD e proliferação de células tumorais indica que o composto teve

efeitos anti-angiogênicos e anti-tumorais profundos, mesmo sob condições nas quais os tumores não regrediram.

A capacidade do composto 80 para inibir a fosforilação de PDGFR e subsequente sinalização *in vivo* também foi avaliada nos tumores SF763T, que expressam níveis elevados de PDGFR β . O tratamento dos tumores SF763T com o composto 80 inibiu fortemente a fosforilação da tirosina PDGFR β em tumores SF763T estabelecidos. O composto 80 também reduziu os níveis de fosfolipase C gama (PLC- γ) (ativada) fosforilada, um indicador a jusante imediato da ativação de PDGFR. Estes dados demonstram que a administração oral do composto 80 provoca um efeito direto sobre a atividade alvo (PDGFR) em tumores *in vivo*. Com base na demonstração de que a capacidade do composto 80 para inibir sinalização dependente de VEGF em HUVECs *in vitro* foi duradoura (*vide supra*) a eficácia do composto foi avaliada quando o composto foi administrado raras vezes no modelo de tumor Colo205. Como mostrado na Tabela 8, 80 mg/kg (91% de inibição) e 40 mg/kg (84% de inibição) foram eficazes quando administrados diariamente, porém não quando administrados duas vezes por semana. Inversamente, uma dose mais elevada do composto 80 (160 mg/kg) inibiu (52% de inibição) o desenvolvimento de tumores Colo205 estabelecidos quando administrada duas vezes por semana, sugerindo que este composto pode demonstrar eficácia quando administrado raras vezes em uma dosagem mais elevada. Deve-se observar que os regimes de dosagem podem ser determinados por aqueles versados na técnica sem experimentação indevida.

TABELA 8

Dosagem (mg/kg)	Freqüência	% Inibição	Valor-P
160	Duas vezes por semana	52	0,085
	Uma vez por semana	17	NS
80	Diariamente	91	0,039
	Duas vezes por semana	19	NS
	Uma vez por semana	0	NS
40	Diariamente	84	0,028
	Duas vezes por semana	36	NS
NS: não significativo (P >0,05)			

Resumidamente, os resultados mostrados na Tabela 8 foram obtidos utilizando células Colo205 ($0,5 \times 10^6$ de células/camundongo) que tiveram SC implantadas na região do flanco posterior de camundongos atímicos. A administração oral do composto 80 de acordo com a programação indicada foi iniciada quando os tumores atingiram 400 mm^3 . Os tumores foram medidos utilizando paquímetros Vernier e o volume do tumor foi calculado como o produto de comprimento x largura x altura. Os valores P foram calculados mediante comparação do tamanho dos tumores para animais que foram tratados com o composto 80 (n = 8) com aqueles de animais que foram tratados com um veículo (n = 16) no último dia do

experimento, utilizando o teste t de Student de duas caudas.

ii. Eficácia do Composto 80 em um Modelo de Doença Disseminada.

5 Além de sustentar o crescimento contínuo de tumores primários sólidos, a angiogênese é também um componente essencial na sustentação do desenvolvimento de doença disseminada devido a metástase proveniente do tumor primário. O efeito do composto 80 sobre o desenvolvimento
10 de doença disseminada foi examinado no modelo de colonização pulmonar do melanoma em camundongo B16-F1. Neste modelo, as células B16-F1 inoculadas intravenosamente através da veia da cauda de camundongos atímicos colonizam os pulmões e formam tumores. Como mostrado na Tabela 8, a
15 administração oral do composto 80 a 80 mg/kg/dia reduziu eficazmente a carga das células B16-F1 no pulmão como avaliado pelas medições do peso total do pulmão. Estes dados sugerem que o composto 80 pode inibir doença disseminada *in vivo*.

20 **TABELA 9**

	Peso do Pulmão (g)	% Inibição	Valor-P
Veículo	0,83 ± 0,07	-	-
Composto ¹	0,41 ± 0,04	50	<0,001
¹ Composto 80			

Resumidamente, os resultados mostrados na tabela 9 foram obtidos utilizando camundongos atímicos que tinham sido inoculados com células tumorais B16-F1 (5×10^5 células/camundongo) através da veia da cauda. Os
25 camundongos foram tratados diariamente com composto 80

administrado oralmente a 80 mg/kg/dia (n = 10) ou veículo (n = 18) durante 24 dias após a inoculação das células tumorais. No final do período de tratamento, os camundongos foram sacrificados e seus pulmões removidos e pesados. A percentagem de inibição foi calculada mediante comparação do o peso do pulmão daqueles animais que tinham sido tratados com o composto 80, com o peso do pulmão dos animais que tinham sido tratados apenas com o veículo. Valores de P foram determinados utilizando o teste Student t de duas caudas.

D. Exemplos de Atividade Biológica

Exemplos da potência de compostos *in vitro* desta invenção são mostrados na Tabela 2.

Conclusão

Em estudos para investigar as características farmacocinéticas dos compostos das modalidades preferidas da presente invenção demonstrou-se que a administração oral de uma dose única dos referidos compostos resultou em biodisponibilidade oral elevada em camundongos. As biodisponibilidade oral e farmacocinéticas lineares boas indicam que os compostos das modalidades preferidas da presente invenção possuem características farmacocinéticas favoráveis.

Além disso, os compostos das modalidades preferidas da presente invenção são inibidores potentes da atividade da tirosina quinase das RTKs, Flk-1/KDR e PDGFR do domínio da quinase dividida, que estão envolvidos na angiogênese e a RTK c-kit, um receptor para o fator de célula tronco (SCF), que está envolvido em alguns cânceres hematológicos. A concentrações mais elevadas, os compostos

das modalidades preferidas da presente invenção também inibem a atividade da tirosina quinase de FGFR-1, uma terceira RTK envolvida na angiogênese. De acordo com a sua atividade bioquímica, os compostos das modalidades

5 preferidas da presente invenção inibem a fosforilação da tirosina dependente de ligante de RTKs alvo e a resposta mitogênica *in vitro* de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) estimuladas por VEGF ou FGF, de células NIH-3T3 que expressam PDGFR estimuladas por PDGF e

10 de células de leucemia mielóide aguda MO7E estimuladas com SCF. Em contrapartida, os compostos das modalidades preferidas da presente invenção não inibem diretamente a proliferação de células tumorais no meio de desenvolvimento completo exceto a concentrações de 2 a 3 ordens de

15 magnitude mais elevadas do que as necessárias para inibir as respostas mitogênicas dependentes de ligante. Em estudos de xenoenxertos de camundongos, os compostos das modalidades preferidas da presente invenção inibiram o desenvolvimento de tumores humanos estabelecidos de

20 diversas origens em um modo dependente de dosagem e a concentrações que foram bem toleradas mesmo após dosagem prolongada (> 100 dias). A 80 mg/kg/dia, os compostos das modalidades preferidas da presente invenção induziram a regressão de grandes tumores A431 e Colo205 estabelecidos e

25 provocaram inibição ou estase substancial do desenvolvimento de tumores SF763T e MCI-H460. Em camundongos com tumores SF763T, os compostos das modalidades preferidas da presente invenção provocaram reduções na densidade de microvasos, na fosforilação de

30 PDGFR nos tumores e índice mitótico nas células tumorais.

Com esta dosagem, os compostos das modalidades preferidas da presente invenção também inibiram a colonização do pulmão por células tumorais B16-F1 em um modelo de metástase tumoral. Estudos sobre os regimes demonstraram
5 que os compostos das modalidades preferidas da presente invenção são mais eficazes quando administrados diariamente. A prova direta da atividade anti-angiogênica dos compostos das modalidades preferidas da presente invenção foi detectada em tumores SF763T em que a densidade
10 dos microvasos foi reduzida. A prova direta de que os compostos das modalidades preferidas da presente invenção inibem a fosforilação de PDGFR e a sinalização *in vivo* também foi obtida em tumores SF763T.

Em conjunto, estes dados sustentam a noção de que
15 compostos administrados oralmente das modalidades preferidas da presente invenção são agentes anti-angiogênicos para o tratamento de cânceres, incluindo tumores sólidos e malignidades hematológicas em que a angiogênese e/ou sinalização através de c-kit são
20 importantes na patologia da doença.

Deve-se entender que os compostos, métodos e composições farmacêuticas da presente invenção são eficazes na regulação da atividade de PK e, por conseguinte, espera-se que sejam eficazes como agentes terapêuticos contra
25 doenças associadas a RTK, CTK e STK.

Aquele versado na técnica deveria também entender facilmente que a presente invenção está bem adaptada para que se realizem os objetivos e se obtenham os propósitos e vantagens mencionados, bem como aqueles inerentes aqui. Os
30 complexos moleculares e os métodos, procedimentos,

tratamentos, moléculas, compostos específicos descritos aqui são presentemente representativos de modalidades preferidas, são exemplificativos e não se destinam a limitar o âmbito da invenção. Alterações dos mesmos e
5 outras utilizações ocorrerão àqueles versados na técnica alterações que se enquadrem dentro do espírito da invenção e sejam definidas pelo âmbito das reivindicações.

Ficará imediatamente claro para aquele versado na técnica que podem ser realizadas diferentes substituições e
10 modificações da invenção descrita aqui sem divergir do âmbito e do espírito da invenção.

Todos os pacientes e publicações mencionados na especificação são indicativos dos níveis daqueles versados na técnica à qual a invenção se refere. Todas as patentes e
15 publicações estão incorporadas aqui mediante referência como se cada publicação individual fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada como referência.

A invenção descrita ilustrativamente aqui pode ser
20 praticada adequadamente na ausência de quaisquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não estejam especificamente descritos aqui. Sendo assim, por exemplo, em cada caso aqui qualquer dos termos "compreendendo", "consistindo essencialmente em" e "consistindo em" pode ser
25 substituído por qualquer dos outros dois termos. Os termos e expressões que foram utilizados são usados como termos de descrição e não de limitação e não existe a intenção de que na utilização de tais termos e expressões se exclua quaisquer equivalentes das características mostradas e
30 descritas ou partes das mesmas, porém entende-se que são

possíveis diversas modificações dentro do âmbito da invenção reivindicada. Sendo assim, deve-se entender que embora a presente invenção tenha sido especificamente descrita por modalidades preferidas e características
5 opcionais, a modificação e alteração dos conceitos descritos aqui podem ser utilizadas por aqueles versados na técnica e que se considera que tais modificações e alterações se enquadrem no âmbito desta invenção como definido pelas reivindicações em anexo.

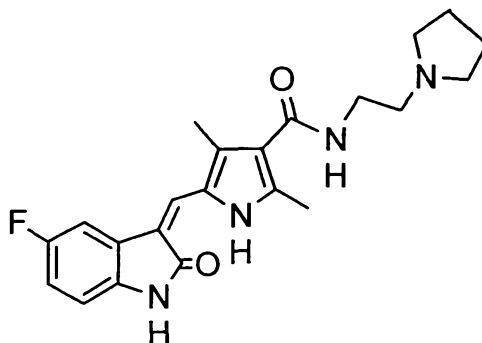
10 Além disso, quando características ou aspectos da invenção forem descritas em termos de grupos Markush, aqueles versados na técnica entenderão que a invenção é também desse modo descrita em termos de qualquer elemento individual ou subgrupo de elementos do grupo Markush. Por
15 exemplo, se X for descrito como

selecionado a partir do grupo que consiste em bromo, cloro e iodo, reivindicações para que X seja bromo e reivindicações para que X seja bromo e cloro são totalmente descritas.

20 Outras modalidades enquadram-se nas reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula



5 ou seus sais farmacologicamente aceitáveis.

2. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o composto como definido na reivindicação 1 ou seus sais farmacologicamente aceitáveis, em associação com carreador ou excipiente farmacologicamente aceitável.

10