

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 239**

51 Int. Cl.:

C07D 473/16 (2006.01)

A61K 31/5375 (2006.01)

C07D 413/12 (2006.01)

C07D 239/70 (2006.01)

C07D 473/24 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2004 E 04800997 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 1682150**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para inducir la desdiferenciación celular**

30 Prioridad:

10.11.2003 US 518947 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.03.2013

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, SHUIBING;
DING, SHENG y
SCHULTZ, PETER, G.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 398 239 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para inducir la desdiferenciación celular

5 **Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad respecto de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/518.947, presentada el 10 de noviembre de 2003.

10 **Antecedentes de la invención**

En los mamíferos, la regeneración de las extremidades y de los tejidos dañados está limitada en gran medida por un procedimiento de diferenciación irreversible (véase, por ejemplo, Carlson, *Dev. Dyn.* 226(2):167-81 (2003)). Por consiguiente, las células madre, en particular, las células madre embrionarias (CME) que se pueden ampliar indefinidamente y son pluripotentes o multipotentes, han sido objeto de una gran atención como enfoque terapéutico para el daño causado por enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento (véase, por ejemplo, Committee on the Biological and Biomedical Applications of Stem Cell Research, *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine 2002*, the National Academies Press, Washington, D.C.). Sin embargo, el uso de células madre en la terapia de reemplazo celular sigue acarreado problemas por una serie de razones, entre las que se incluyen la falta de una fuente fiable de células madre. Por ejemplo, las células madre mesenquimatosas (CMM) humanas multipotentes se pueden aislar de la médula ósea, pero se requiere una gran cantidad de médula ósea del donante para obtener cantidades suficientes de células madre para la mayoría de las aplicaciones terapéuticas o de investigación.

La capacidad de desdiferenciarse o invertir células comprometidas con un linaje en células progenitoras multipotentes (es decir, células madre multipotentes) supera muchos de estos obstáculos. Con un procedimiento de desdiferenciación eficiente, se concibe la posibilidad de usar células adultas sanas, abundantes y fácilmente accesibles para generar diferentes tipos de células funcionales para la reparación de los tejidos dañados. Además, estudios recientes de la plasticidad de miotubos murinos y otras células derivadas de tejidos adultos sugieren que la desdiferenciación puede ser posible en sistemas de mamíferos (véase, por ejemplo, Odelberg *et al.*, *Cell* 103:1099-1109 (2000); McGann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98:13699-13704 (2001) y Tsai *et al.*, "Developmental Cell" 2:707-712 (2002)). Sin embargo, en contraste con el procedimiento de diferenciación, faltan composiciones y procedimientos para el control y el estudio de la desdiferenciación.

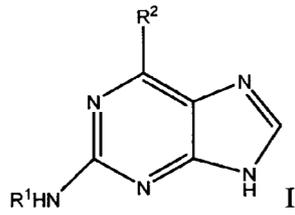
Los ensayos fenotípicos basados en células y, más recientemente, los rastreos de las vías de moléculas pequeñas sintéticas y productos naturales han proporcionado históricamente sondas químicas muy útiles de complejos procesos celulares (véase, por ejemplo, White, D. J. G. Ed., "Proceedings of an International Conference on Cyclosporin A" (Elsevier, Amsterdam, 1982), 5-19). La identificación de pequeñas moléculas que inducen la desdiferenciación de las células somáticas de mamífero debería ayudar a dilucidar el mecanismo molecular de este fenómeno, y en última instancia, puede permitir la regeneración del tejido *in vivo*. Rosania *et al.*, (*Nature Biotech.*, 2000; 18(3): 304 a 308) describen la mioseverina, una molécula de unión a microtúbulos con nuevos efectos celulares. El documento WO 02/051843 describe nuevos derivados de purina, el procedimiento de preparación y su uso como medicinas. Wright *et al.*, (*Journal of Medicinal Chemistry*, 1987; 30(1): 109 a 116) describen la síntesis, la inhibición del crecimiento celular y el rastreo antitumoral de 2-(*p-n*-butilaniilo)purinas y sus análogos nucleósidos. Hildebrand *et al.*, (*Journal of Medicinal Chemistry*, 1990; 33(90): 203 a 206) describen las relaciones entre la estructura y la actividad de las guaninas N²-sustituidas como inhibidores de las timidina quinasas del HSV1 y HSV2. Medveczky *et al.*, (*Journal of Medicinal Chemistry*, 1995; 38(10): 1811 a 1819) describen derivados de haloanilino de pirimidinas, purinas y análogos nucleósidos de purina: síntesis y actividad contra el citomegalovirus humano. El documento WO 01/09134 describe inhibidores de los derivados de purina de la proteína tirosina quinasa SYK.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica por composiciones y procedimientos para inducir la desdiferenciación de células de mamíferos comprometidas con un linaje en células madre multipotentes o pluripotentes. La presente invención cubre estas y otras necesidades.

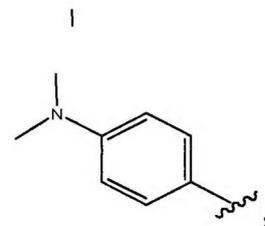
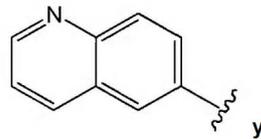
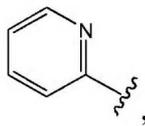
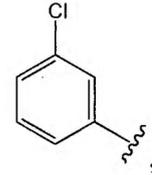
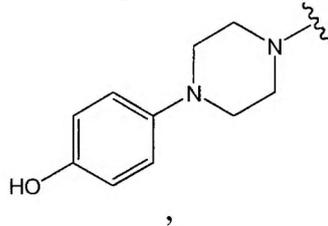
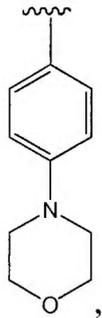
55 **Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona nuevas composiciones y nuevos procedimientos para inducir la desdiferenciación de células de mamífero comprometidas con un linaje en células madre multipotentes.

60 Una realización de la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:

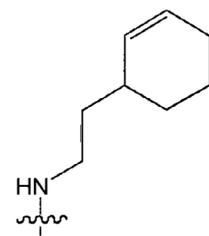
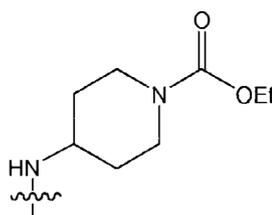
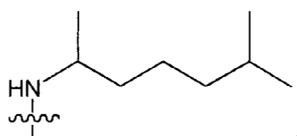
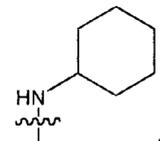
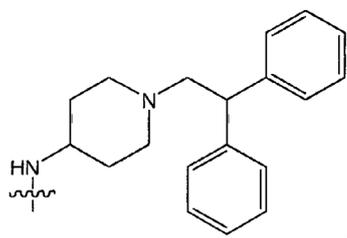
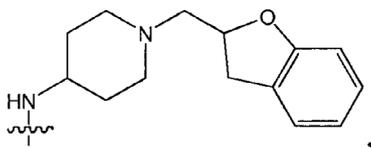
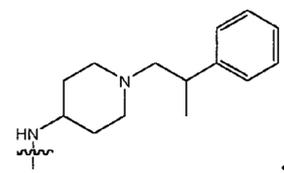
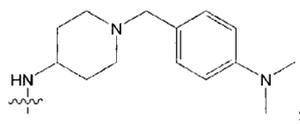
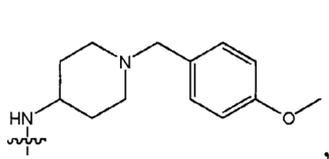


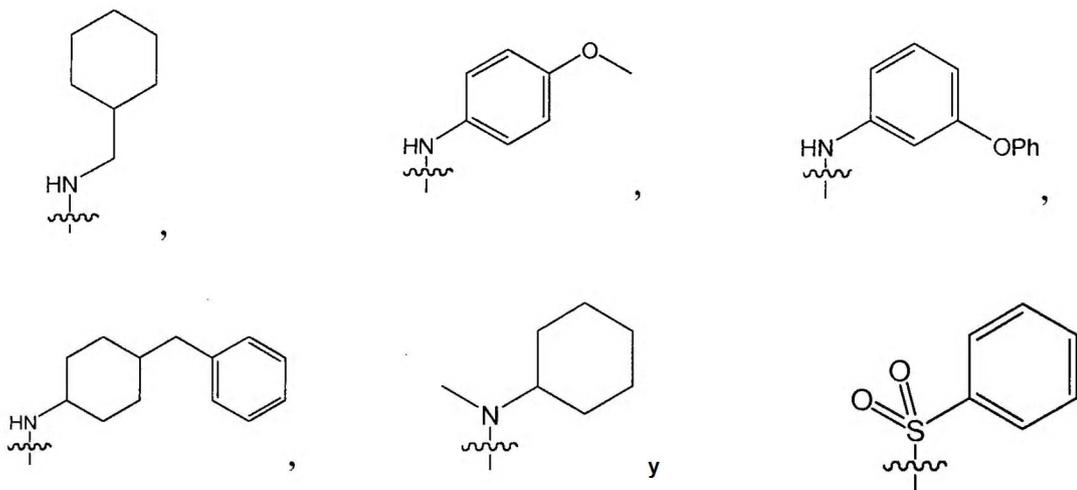
En la Fórmula I, R¹ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:



5

En la Fórmula I, R² es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

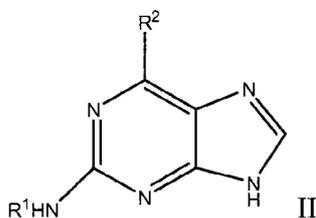




Los compuestos de la presente invención incluyen todas las sales farmacéuticamente aceptables, isómeros, solvatos, hidratos y profármacos de los mismos.

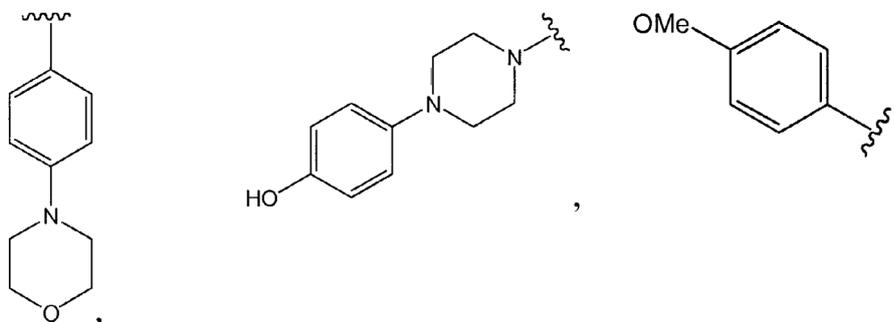
5 Una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una realización adicional de la presente invención es un procedimiento para inducir la desdiferenciación de una célula comprometida con un linaje *ex vivo*, procedimiento que comprende:

10 poner en contacto una célula de mamífero comprometida con un linaje con un compuesto de Fórmula II que tiene la siguiente estructura:

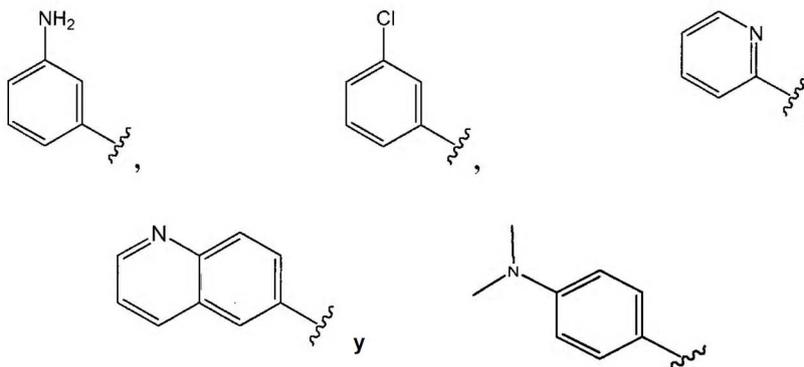


15 en la que:

R¹ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:



20



R^2 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno y $-L-R^3$;

L es un miembro seleccionado del grupo que consiste en -O-, -S- y

$-NR^4$, en el que R^4 es H, o R^4 se toma opcionalmente junto con R^3 y el nitrógeno al que ambos están unidos para formar un heterociclo opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-4} ;

R^3 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en alquilo C_{1-4} , cicloalquilo C_{3-8} y alquilarilo C_{0-2} , sustituido con 0-2 grupos R^{3a} que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-4} , alcoxilo C_{1-4} , $-N(R^{3b}, R^{3b})$, $-SO_2N(R^{3b}, R^{3b})$, $-C(O)N(R^{3b}, R^{3b})$ y -O-arilo, o cuando dichos grupos R^{3a} están en átomos adyacentes del anillo, opcionalmente, se toman conjuntamente para formar un miembro

seleccionado del grupo que consiste en $-O-(CH_2)_{1-2}-O-$, $-O-C(CH_3)_2CH_2-$ y $-(CH_2)_{3-4}$; y

cada grupo R^{3b} es un miembro que se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y

alquilo C_{1-4} ,

mediante el cual la célula de mamífero se desdiferencia en una célula madre multipotente.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además detectar la desdiferenciación de la célula de mamífero en una célula madre multipotente (por ejemplo, mediante la detección de la pérdida de expresión de un gen marcador expresado por la célula de mamífero comprometida con un linaje). En algunas realizaciones, la célula de mamífero comprometida con un linaje es un mioblasto.

Una realización adicional de la presente invención es un procedimiento para producir una célula de un linaje de osteoblastos a partir de una célula comprometida con el linaje, procedimiento que comprende:

(a) poner en contacto una célula comprometida con el linaje con un compuesto de Fórmula II según lo definido anteriormente, mediante lo que la célula comprometida con el linaje se desdiferencia en una célula madre multipotente; y

(b) poner en contacto la célula madre multipotente con un medio de cultivo celular que induzca la diferenciación de la célula madre multipotente en una célula de un linaje de osteoblastos.

También se describe un procedimiento para identificar compuestos que induzcan la desdiferenciación de células de mamífero comprometidas con un linaje en células madre multipotentes. Se pone en contacto una célula de mamífero comprometida con un linaje con un compuesto de prueba sospechoso de inducir la desdiferenciación de las células comprometidas con el linaje. Las células se cultivan en un primer medio de cultivo celular que induce la diferenciación de la célula madre multipotente en un primer tipo de célula y un segundo medio de cultivo celular que induce la diferenciación de la célula madre multipotente en un segundo tipo de célula. Se determina si las células han experimentado la diferenciación en el primer o en el segundo tipo de célula, en el que la inducción de la diferenciación tanto en el primer como en el segundo tipo de célula identifica el compuesto de prueba como un compuesto que induce la desdiferenciación de células de mamífero comprometidas con el linaje. En algunos casos, el primer medio de cultivo celular induce la osteogénesis y el segundo medio de cultivo induce la adipogénesis, y el primer tipo de célula es un osteoblasto y el segundo tipo de célula es un adipocito. En algunos casos, el compuesto de prueba es un miembro seleccionado del grupo que consiste en: purinas sustituidas (por ejemplo, una purina 2,6-disustituida), pirimidinas, quinazolininas, pirazinas, pirrolopirimidina, pirazolopirimidina, ftalazinas, piridazinas y quinoxalinas. En algunos casos, la inducción de la osteogénesis se detecta mediante la detección de la expresión de un gen marcador de la osteogénesis (por ejemplo, fosfatasa alcalina, colágeno de tipo I, osteocalcina y osteoponina) y la inducción de la adipogénesis se detecta mediante la detección de la expresión de un gen marcador de la adipogénesis (por ejemplo, ob , Ucp, PPAR γ y C/EBP (véase, por ejemplo, Kozak y Kozak, *Endocrinology*, 134 (2):906-13 (1994) y Lee *et al.*, *J. Clin. Invest.* 111(4): 453-461 (2003)).

También se describe un procedimiento para tratar un trastorno óseo (por ejemplo, osteoporosis, raquitismo, osteomalacia, síndrome de McCune-Albright o enfermedad de Paget). Se pone en contacto una célula de mamífero con un compuesto de Fórmula II, mediante lo cual la célula de mamífero se desdiferencia en una célula madre multipotente. La célula madre multipotente se cultiva en un medio de cultivo celular que induce la diferenciación de la

célula madre multipotente en una célula de un linaje de osteoblastos. En algunos casos, el medio de cultivo celular que induce la diferenciación de la célula madre multipotente en una célula de un linaje de osteoblastos comprende ácido ascórbico, dexametasona y β -glicerofosfato. En algunos casos, la célula de mamífero está unida a un soporte sólido (por ejemplo, una matriz tridimensional o una superficie plana). En algunas realizaciones, la administración se realiza mediante implantación quirúrgica.

Otras realizaciones y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que se presenta a continuación.

10 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el procedimiento de rastreo para identificar compuestos con actividad inductora de la desdiferenciación.

15 La Figura 2 ilustra la estructura del Compuesto A.

Descripción detallada de la invención

20 I. Introducción

La presente invención proporciona compuestos, composiciones y procedimientos para desdiferenciar células de mamífero comprometidas con un linaje en células madre (por ejemplo, células multipotentes o pluripotentes). Más particularmente, la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I según lo definido anteriormente que son útiles para desdiferenciar una célula de mamífero comprometida con un linaje en células madre. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende el compuesto de Fórmula I. En otras realizaciones, se proporcionan procedimientos para introducir la desdiferenciación de células de mamífero comprometidas con un linaje en células madre. En otra realización, las células madre se diferencian además en una célula comprometida con un linaje de osteoblastos. También se describen procedimientos de identificación de compuestos adicionales útiles para inducir la desdiferenciación de células comprometidas con un linaje en células madre.

30 II. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen generalmente el mismo significado entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. En general, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio para la química orgánica y analítica son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinación de los mismos, que puede estar completamente saturada, mono- o poliinsaturada y que puede incluir radicales di- y multivalentes que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir C_1 - C_{10} significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales de hidrocarburo saturados incluyen grupos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *t*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es aquél que tiene uno o más enlaces dobles o triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir aquellos derivados de alquilo definidos más detalladamente a continuación como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos de hidrocarburo se denominan "homoalquilo".

El término "alquilenos", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un alcano, como el ejemplificado por $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, e incluye además aquellos grupos descritos más adelante como "heteroalquilenos". Típicamente, un grupo alquilo (o alquilenos) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, prefiriéndose en la presente invención aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo inferior" o "alquilenos inferior" es un grupo alquilo o alquilenos de cadena más corta que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono.

Los términos "alcoxilo", "alquilamino" y "alquiltio" (o tialcoxilo) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula mediante un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada estable, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en la que el nitrógeno y el azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el

heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El/los heteroátomo/s de O, N y S pueden estar situados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. El heteroátomo de Si puede estar situado en cualquier posición del grupo heteroalquilo, incluyendo la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH=CH-O-CH}_3$, $-\text{Si(CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH=N-OCH}_3$ y $-\text{CH=CH-N(CH}_3\text{)-CH}_3$. Puede haber hasta dos heteroátomos consecutivos tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{-NH-OCH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{-O-Si(CH}_3)_3$. De igual manera, el término "heteroalquilenos", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como los ejemplificados por $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ y $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$. Para los grupos heteroalquilenos, los heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos de los extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxilo, alquilendioxilo, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Aún más, para los grupos ligadores de alquilenos y heteroalquilenos, no se sugiere ninguna orientación del grupo ligador.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo y 2-piperazinilo.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, los términos tales como "haloalquilo", pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, la expresión "haloalquilo (C₁-C₄)" pretende incluir trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo y 3-bromopropilo.

El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente hidrocarbonado poliinsaturado, comúnmente aromático, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (hasta tres anillos) que están condensados juntos o enlazados covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de cero a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y de azufre están opcionalmente oxidados, y el/los átomo/s de nitrógeno está/n opcionalmente cuaternizado/s. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isquinolilo, 5-isquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo anteriormente indicados se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

Por razones de brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxilo, ariltoxilo, arilalquilo) incluye anillos tanto de arilo como de heteroarilo según lo definido anteriormente. Así pues, el término "arilalquilo" se entiende que incluye aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo aquellos grupos alquilo en los que se ha reemplazado un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno), por ejemplo, por un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo).

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretenden incluir tanto formas sustituidas como no sustituidas del radical indicado. A continuación, se proporcionan los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados habitualmente como alquilenos, alquilenos, heteroalquilenos, heteroalquilenos, alquilenos, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilenos y heterocicloalquilenos) pueden ser una variedad de grupos seleccionados entre: $-\text{OR}'$, $=\text{O}$, $=\text{NR}'$, $=\text{N-OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, $-\text{halógeno}$, $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$, $-\text{OC(O)R}'$, $-\text{C(O)R}'$, $-\text{CO}_2\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{OC(O)NR}'\text{R}''$, $-\text{NR}''\text{C(O)R}'$, $-\text{NR}'\text{-C(O)NR}''\text{R}'''$, $-\text{NR}''\text{C(O)}_2\text{R}'$, $-\text{NH-C(NH}_2\text{)=NH}$, $-\text{NR}'\text{C(NH}_2\text{)=NH}$, $-\text{NH-C(NH}_2\text{)=NR}'$, $-\text{S(O)R}'$, $-\text{S(O)}_2\text{R}'$, $-\text{S(O)}_2\text{NR}''\text{R}'''$, $-\text{CN}$ y $-\text{NO}_2$ en un número que oscila de cero a $(2m' + 1)$, en la que m' es el número total de átomos de carbono de dicho radical. R' , R'' y R''' se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, alquilo y heteroalquilo (C₁-C₈) no sustituidos, arilo no sustituido, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo no sustituido, grupos alcoxilo o tioalcoxilo, o arilalquilo (C₁-C₄). Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, $-\text{NR}'\text{R}''$ pretende incluir 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Como se usan en la presente memoria, R' y R'' son plenamente aplicables a R^{3a} y R^{3b} . De la descripción anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos tales como haloalquilo (por ejemplo, $-\text{CF}_3$ y $-\text{CH}_2\text{CF}_3$) y acilo (por ejemplo, C(O)CH_3 , $-\text{C(O)CF}_3$, $-\text{C(O)CH}_2\text{OCH}_3$).

De manera similar, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan entre: halógeno, $-\text{OR}'$, $-\text{OC(O)R}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, $-\text{R}'$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CO}_2\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{C(O)R}'$, $-\text{OC(O)NR}'\text{R}''$, $-\text{NR}''\text{C(O)R}'$, $-\text{NR}'\text{-C(O)}_2\text{R}'$, $-\text{NR}'\text{-C(O)NR}''\text{R}'''$, $-\text{NH-C(NH}_2\text{)=NH}$, $-\text{NR}'\text{C(NH}_2\text{)=NH}$, $-\text{NH-C(NH}_2\text{)=NR}'$, $-\text{S(O)R}'$, $-\text{S(O)}_2\text{R}'$, $-\text{S(O)}_2\text{NR}''\text{R}'''$, $-\text{N}_3$

, -CH(Ph)₂, perfluoroalcoxilo (C₁-C₄) y perfluoroalquilo (C₁-C₄), en un número que varía de cero hasta el número total de valencias libres del sistema de anillos aromáticos; y en los que R', R'' y R''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo y heteroalquilo (C₁-C₈), arilo y heteroarilo no sustituidos, (arilo no sustituido)-alquilo (C₁-C₄) y (arilo no sustituido)-oxialquilo (C₁-C₄).

5 Dos de los sustituyentes de átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente con un sustituyente de fórmula -T-C(O)-(CH₂)_q-U-, en la que T y U son independientemente -NH-, -O-, -CH₂- o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 2. Alternativamente, dos de los sustituyentes de átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente de la
10 fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en la que A y B son independientemente -CH₂-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 3. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede estar opcionalmente sustituido con un enlace doble. Alternativamente, dos de los sustituyentes de átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente de
15 fórmula -(CH₂)_s-X-(CH₂)_t, en la que s y t son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂- o -S(O)₂NR'-. El sustituyente R' de -NR'- y -S(O)₂NR'- se selecciona entre hidrógeno o alquilo (C₁-C₆) no sustituido.

Los términos "halo" o "halógeno", como se usan en la presente memoria, se refieren a sustituyentes Cl, Br, F o I. El término "haloalquilo" y similares se refieren a un radical de carbono alifático que tiene al menos un átomo de hidrógeno reemplazado por un átomo de Cl, Br, F o I, incluyendo mezclas de diferentes átomos de halógeno. Trihaloalquilo incluye, por ejemplo, trifluorometilo como radical preferido.

Los términos "alcoxilo", "alquilamino" y "alquiltio" (o tialcoxilo) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula mediante un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria, el término "heteroátomo" pretende incluir oxígeno (O), nitrógeno (N) y azufre (S).

30 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes encontrados en particular en los compuestos descritos en la presente memoria. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, bien pura o en un disolvente inerte
35 adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de
40 ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o de fósforo, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como ácido acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, *p*-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato, y sales de ácidos
45 orgánicos tales como ácidos glucurónico o galacturónico (véase, por ejemplo, Berge, S. M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten la conversión de los compuestos bien en sales de adición de base o en sales de adición de ácido.

50 Las formas neutras de los compuestos se pueden regenerar poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto precursor de la manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto para los fines de la presente invención.

55 Además de las formas de sal, la presente invención proporciona compuestos que están en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos en la presente memoria son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas, proporcionando los compuestos de la presente invención. Además, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente invención mediante procedimientos químicos o bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los
60 compuestos de la presente invención cuando se colocan en un reservorio de parche transdérmico con una enzima o un reactivo químico adecuados.

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende que estén englobadas en el alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son

equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención.

5 Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; se pretende que los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales estén englobados en el alcance de la presente invención.

10 Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar marcados radiactivamente con isótopos radiactivos tales como por ejemplo tritio (³H), yodo-125 (¹²⁵I) o carbono-14 (¹⁴C). Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, bien radiactivas o no, estén comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

15 Una "célula comprometida con un linaje", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier célula que se haya diferenciado o se vaya a diferenciar en un determinado tipo de célula o tipos de células relacionadas. Las células comprometidas con un linaje incluyen, por ejemplo, osteoblastos, mioblastos, condrocitos y adipocitos.

20 La "célula madre", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier célula pluripotente de auto-renovación o célula multipotente o célula progenitora o célula precursora que sea capaz de diferenciarse en múltiples tipos de células. Las células madre incluyen aquéllas que son capaces de diferenciarse en células del linaje de los osteoblastos, un linaje de células mesenquimatosas (por ejemplo, hueso, cartílago, tejido adiposo, músculo, estroma, incluyendo estroma hematopoyético de apoyo y tendón).

25 "Diferenciar" o "diferenciación", como se usa en la presente memoria, se refiere al procedimiento mediante el cual las células precursoras o progenitoras (es decir, las células madre) se diferencian en tipos de células específicos, por ejemplo, en osteoblastos. Las células diferenciadas pueden ser identificadas por sus patrones de expresión de genes y la expresión de proteínas de la superficie celular. Por ejemplo, las células de un linaje de osteoblastos típicamente expresan los siguientes genes: fosfatasa alcalina, colágeno de tipo I, osteocalcina y osteoponina, y los siguientes factores de transcripción específicos de huesos: *Cbfa1/Runx2*, *Osx*, *gsc*, *Dlx1*, *Dlx5*, *Msx1*, *Cart1*, *Hoxa1*, *Hoxa2*, *Hoxa3*, *Hoxbl*, *rae28*, *Twist*, *AP-2*, *Mfl*, *Pax1*, *Pax3*, *Pax9*, *TBX3*, *TBX4*, *TBX5* y *Brachyury* (véase, por ejemplo, Olsen *et al.*, 2000 *supra* y Nakashima *et al.*, *Cell* 108 (1):17-29 (2002)). Como un ejemplo adicional, las células de un linaje de mioblastos típicamente expresan los siguientes genes: MyoD, Myf5, miosina, CD56 y desmina (véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, *J. Cell Physiol.* 196(1):70-8 (2003)). Como otro ejemplo, las células de un linaje de adipocitos expresan típicamente los siguientes genes: *ob*, *Ucp*, *PPARγ* y *CIEBP* (véase, por ejemplo, Kozak y Kozak, *Endocrinology* 134(2):906-13 (1994)) y Lee *et al.*, *J. Clin. Invest.* 111 (4): 453-461 (2003).

40 "Desdiferenciarse" o "desdiferenciación", como se usa en la presente memoria, se refiere al procedimiento mediante el cual las células comprometidas en un linaje (por ejemplo, mioblastos u osteoblastos) invierten su compromiso con el linaje y se convierten en células precursoras o progenitoras (es decir, células madre multipotentes o pluripotentes). Las células desdiferenciadas se pueden identificar por la pérdida de los patrones de expresión de genes y expresión de proteínas de la superficie celular asociados con las células comprometidas con el linaje. Por ejemplo, los mioblastos típicamente expresan, entre otros, MyoD, miosina, CD56 y desmina. Una pérdida de la expresión o la disminución de los niveles de expresión de uno o más de estos genes indican que un mioblasto ha sufrido una desdiferenciación.

45 "Transdiferenciación" se refiere al procedimiento mediante el cual las células precursoras o progenitoras (es decir, las células madre) previamente comprometidas con tipos de células de un linaje se diferencian en tipos específicos de células de otro linaje, por ejemplo, los preadipocitos se transdiferencian en osteoblastos o los mioblastos se transdiferencian en osteoblastos. Las células transdiferenciadas se pueden identificar por sus patrones de expresión de genes y expresión de proteínas de la superficie celular. Típicamente, las células de un linaje de osteoblastos expresan genes tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, colágeno de tipo I, osteocalcina y osteoponina; factores de transcripción específicos de los huesos tales como, por ejemplo, *Cbfa1/Runx2*, *Osx*, *gsc*, *Dlx1*, *Dlx5*, *Msx1*, *Cart1*, *Hoxa1*, *Hoxa2*, *Hoxa3*, *Hoxbl*, *rae28*, *Twist*, *AP-2*, *Mfl*, *Pax1*, *Pax3*, *Pax9*, *TBX3*, *TBX4*, *TBX5* y *Brachyury* (véase, por ejemplo, Olsen *et al.*, 2000 *supra* y Nakashima *et al.*, *Cell* 108(1):17-29 (2002)).

55 "Osteogénesis", Como se usa en la presente memoria, se refiere a la proliferación de las células óseas y el crecimiento de tejido óseo (es decir, la síntesis y el depósito de nueva matriz ósea). La osteogénesis también se refiere a la diferenciación o transdiferenciación de células progenitoras o precursoras en células óseas (es decir, en osteoblastos). Las células progenitoras o precursoras pueden ser células madre pluripotentes tales como, por ejemplo, células madre mesenquimatosas. Las células progenitoras o precursoras pueden ser células previamente comprometidas con un linaje de osteoblastos (por ejemplo, preosteoblastos) o células que no están previamente comprometidas con un linaje de osteoblastos (por ejemplo, preadipocitos o mioblastos).

65 Un "soporte sólido", como se usa en la presente memoria en relación con la inducción de la osteogénesis, se refiere a una matriz tridimensional o a una superficie plana en la que se pueden cultivar las células madre. El soporte sólido se puede obtener de sustancias de origen natural (es decir, a base de proteínas) o sustancias sintéticas. Por

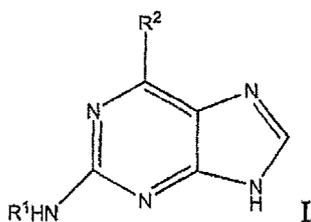
ejemplo, las matrices a base de sustancias de origen natural pueden estar compuestas de fragmentos óseos autólogos o sustitutos óseos comercialmente disponibles según lo descrito, por ejemplo, en Clokie *et al.*, *J. Craniofac. Surg.* 13(1):111-21 (2002) e Isaksson, *Swed. Dent. J Supl.* 84:1-46 (1992). Las matrices sintéticas adecuadas se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 5.041.138, 5.512.474 y 6.425.222. Por ejemplo, se pueden usar polímeros biodegradables artificiales tales como ácido poliglicólico, poliortoéster o polianhídrido para el soporte sólido. También son adecuados el carbonato de calcio, el aragonito y cerámicas porosas (por ejemplo, cerámica densa de hidroxiapatita) para su uso en el soporte sólido. También se pueden usar polímeros tales como polipropileno, polietilenglicol y poliestireno en el soporte sólido. Las células cultivadas y diferenciadas sobre un soporte sólido que sea una matriz tridimensional, típicamente, crecen en todas las superficies de la matriz, por ejemplo, interna y externa. Las células cultivadas y diferenciadas sobre un soporte sólido que sea plano, típicamente crecen en una monocapa. La expresión "soporte sólido" también se usa en el contexto de la preparación de los compuestos de Fórmula I. En este contexto, "soporte sólido" se refiere a un soporte polimérico, tal como una perla, que puede ser parcialmente soluble en un disolvente adecuado o completamente insoluble, y se usa, por ejemplo, para unir un reactante o un reactivo de la reacción. Los soportes sólidos adecuados incluyen, pero sin limitación, resina de PAL, resina de Wang y resina de poliestireno.

"Cultivo", como se usa en la presente memoria, se refiere a mantener las células en condiciones en las que puedan proliferar, diferenciarse y evitar la senescencia. Las células se pueden cultivar en medios de cultivo que contengan los factores de crecimiento apropiados.

III. Compuestos de la presente invención y procedimientos para su preparación

A. Los compuestos de Fórmula I

En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I:

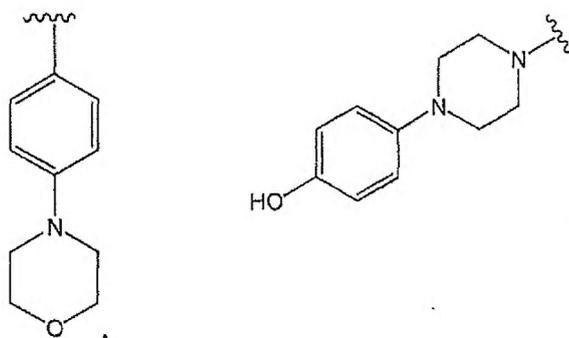


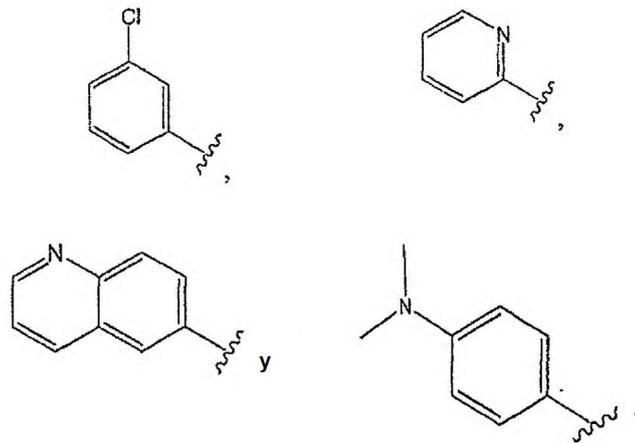
R¹ es un grupo funcional y se define más adelante.

En la Fórmula I, R² es un grupo funcional y se define más adelante.

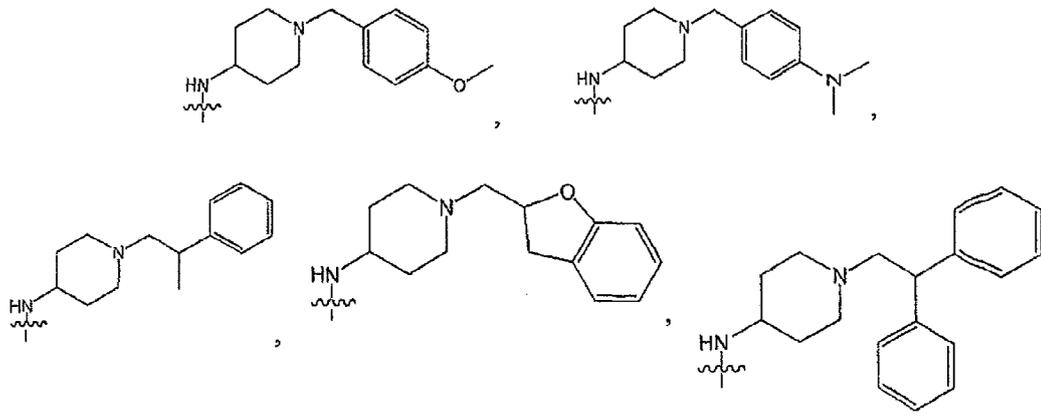
Los compuestos de la presente invención incluyen todas las sales farmacéuticamente aceptables, isómeros, solvatos, hidratos y profármacos de los mismos.

R¹ es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en:

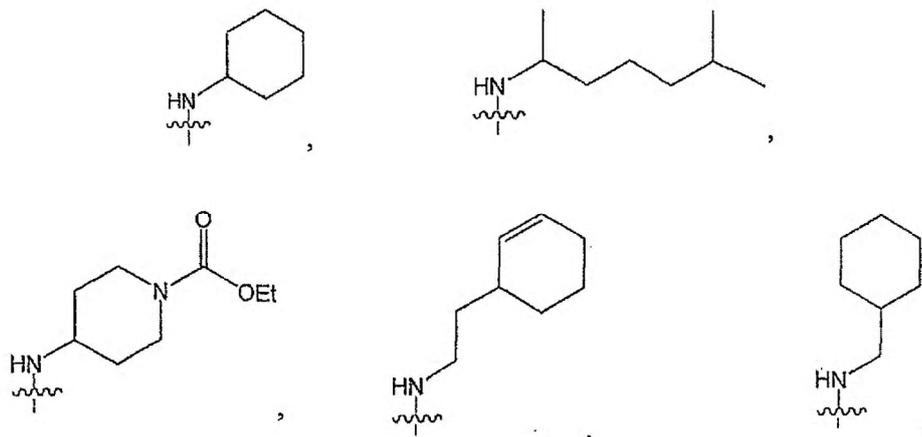


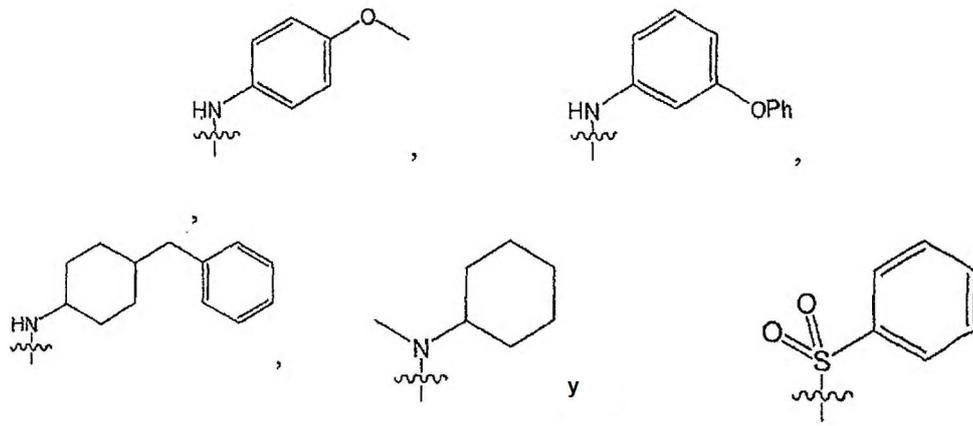


R^2 es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en:

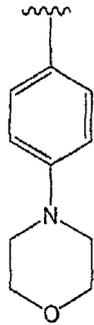


5



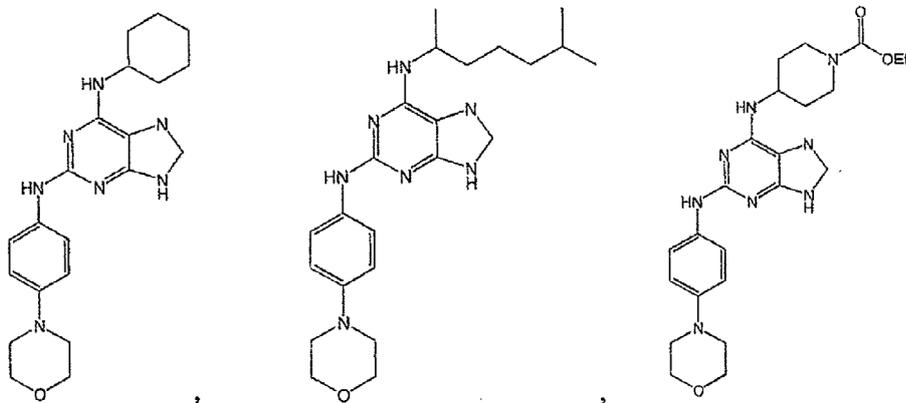
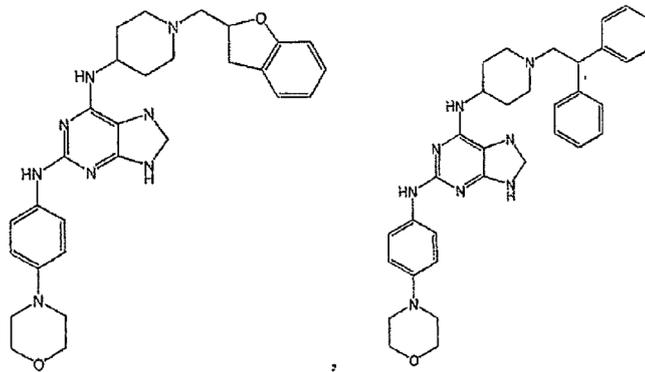
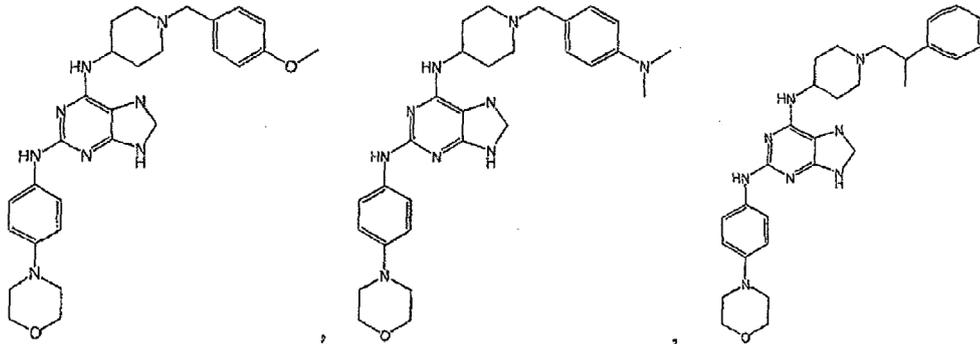


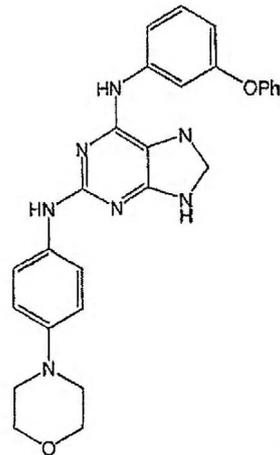
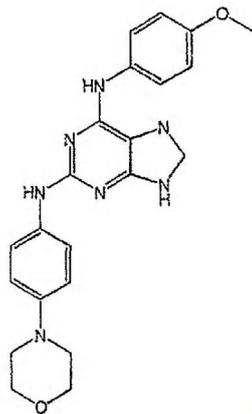
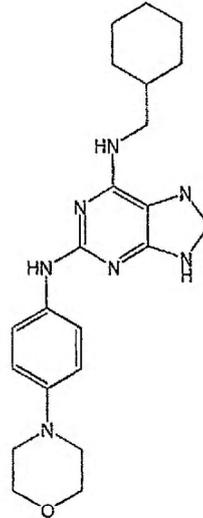
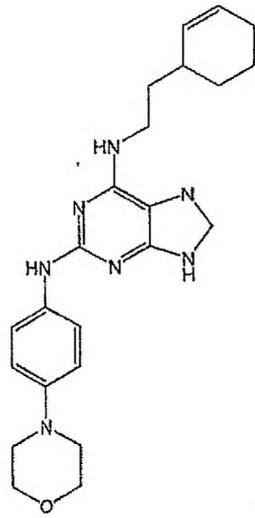
En algunas realizaciones, R¹ es



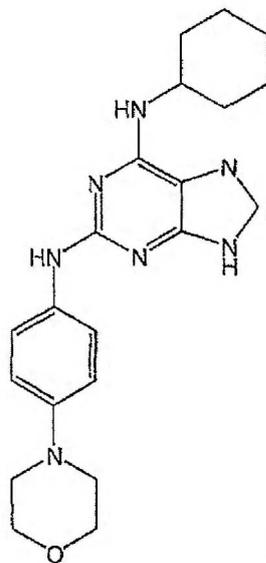
5

Los compuestos preferidos de la presente invención incluyen los siguientes compuestos:





En una realización particularmente preferida, el compuesto tiene la siguiente estructura:



(Compuesto A)

Los compuestos de Fórmula I se pueden rastrear fácilmente en cuanto a su capacidad para inducir la desdiferenciación de células de mamífero comprometidas con un linaje (es decir, para generar células madre) mediante los procedimientos de rastreo establecidos a continuación y, en particular, en los ejemplos.

5 B. Preparación de los compuestos

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante síntesis bien en fase sólida o en fase líquida.

10 1. Síntesis en fase sólida

Los procedimientos dirigidos a la síntesis en fase sólida de los compuestos de Fórmula I se describen en la presente memoria en el Ejemplo I, así como en Ding *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:1594 (2002) y en la solicitud de patente estadounidense n.º de serie 10/687,220, presentada el 15 de octubre de 2003 (con n.º de expediente 021288-001820US), la solicitud de patente estadounidense n.º 60/328.763, presentada el 12 de octubre de 2001, la solicitud de patente estadounidense n.º 60/331.835, presentada el 20 de noviembre de 2001, la solicitud de patente estadounidense n.º 60/346.480, presentada el 7 de enero de 2002, la solicitud de patente estadounidense n.º 60/348.089, presentada el 10 de enero de 2002, y la solicitud de patente estadounidense n.º 10/270.030, presentada el 12 de octubre de 2002 (con n.º de expediente 21288-000340).

En la presente memoria, se describe un procedimiento para sintetizar un heteroarilo sustituido, procedimiento que comprende: (a) proporcionar un resto dihaloheteroarilo estructural, y (b) capturar el resto dihaloheteroarilo estructural sobre una resina mediante sustitución nucleófila de un primer halógeno con un nucleófilo de amina unido a resina para proporcionar un heteroarilo sustituido, por ejemplo, un monohaloheteroarilo sustituido con amina unido a resina; (c) hacer reaccionar el segundo halógeno con una amina o un alcohol arílico adecuadamente sustituido, proporcionando el heteroarilo sustituido unido a resina; y (d) escindir el heteroarilo sustituido de la resina.

Las resinas adecuadas útiles para la presente invención incluyen resina de PAL, resina de Wang y resina de poliestireno. Otras resinas adecuadas serían evidentes para el experto en la técnica. En un caso preferido, se utiliza la resina de PAL.

En un caso preferido, los dos halógenos, es decir, los grupos halo del resto dihaloheteroarilo estructural se seleccionan independientemente e incluyen cloro, flúor, bromo y yodo. En casos preferidos en la actualidad, los dos halógenos son grupos cloro.

En un caso preferido, el procedimiento comprende además la sustitución del segundo halógeno del resto dihaloheteroarilo estructural mediante desplazamiento nucleófilo o, alternativamente, mediante una reacción de acoplamiento. En un caso preferido en la actualidad, se emplea una reacción de acoplamiento para llevar a cabo la sustitución del segundo halógeno del resto dihaloheteroarilo estructural. A este respecto, la reacción de acoplamiento es preferentemente una reacción de acoplamiento mediada por paladio.

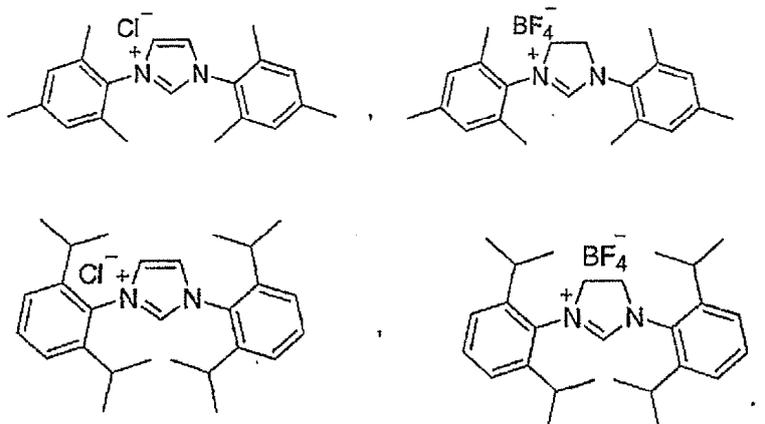
Será evidente para los expertos en la técnica que los dos halógenos, es decir, los grupos halo, del resto dihaloheteroarilo estructural pueden estar sustituidos con un número de grupos funcionales diferentes. Los grupos funcionales adecuados incluyen anilinas, fenoles, aminas y ácidos borónicos. En un caso preferido, los grupos funcionales incluyen ácidos arilborónicos, anilinas y fenoles.

En los compuestos de uso en los procedimientos de la presente invención, N9 preferentemente no está sustituido. Sin embargo, si se desea sustituir N9, es posible realizar una sustitución inicial de N9 antes de la sustitución del primer halógeno del resto dihaloheteroarilo estructural. En un caso preferido, la sustitución inicial se lleva a cabo mediante una reacción que incluye reacciones de alquilación, reacciones de acilación y reacciones de acoplamiento.

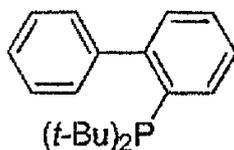
Se pueden usar numerosos restos dihaloheteroarilo estructurales en los procedimientos de la presente invención. Los ejemplos de restos dihaloheteroarilo estructurales adecuados incluyen purinas, pirimidinas, quinazolininas, pirazinas, ftalazinas, piradazinas y quinoxalinas. En casos preferidos, el resto dihaloheteroarilo estructural es una purina.

Cuando se emplea una reacción de acoplamiento catalizada por paladio para sustituir los grupos halo del dihaloheteroarilo o del grupo halo del monohaloheteroarilo sustituido con amina unido a resina, la reacción de acoplamiento catalizada por paladio típicamente implica la reacción del dihaloheteroarilo o del monohaloheteroarilo sustituido con amina unido a resina con un agente de acoplamiento en presencia de un disolvente, un catalizador de paladio, una base y un ligando de carbeno o fosfina. Los agentes de acoplamiento adecuados incluyen ácidos borónicos, aminas y alcoholes. En un caso preferido en la actualidad, los agentes de acoplamiento adecuados incluyen ácidos arilborónicos, anilinas y fenoles.

En los procedimientos anteriores, se pueden usar ligandos de carbeno o de fosfina. Los ejemplos de ligandos adecuados para su uso en los procedimientos anteriores incluyen los siguientes ligandos de carbeno y de fosfina:

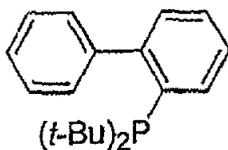


y



5

En caso preferido en la actualidad, el ligando es un ligando de fosfina que incluye el siguiente:



- 10 Para llevar a cabo los procedimientos anteriores, se puede usar una serie de bases. Los ejemplos de bases adecuadas para su uso en el procedimiento anterior incluyen carbonato de cesio, carbonato de potasio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, bicarbonato de cesio, fluoruro de potasio, fosfato de potasio, *terc*-butilóxido de potasio, *terc*-butilóxido de sodio y trietilamina.
- 15 Para llevar a cabo los procedimientos anteriores, se puede usar una serie de disolventes. Los ejemplos de disolventes adecuados para su uso en el procedimiento anterior incluyen 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, dimetoxietano (DME), dimetilformamida (DMF), benceno y tolueno.
- 20 Para llevar a cabo los procedimientos anteriores, se puede usar una serie de catalizadores. Típicamente, el estado de oxidación del paladio en el catalizador es (0) o (II). Los ejemplos de catalizadores de paladio adecuados para su uso en llevar a cabo los procedimientos de la presente invención incluyen Pd₂(dba)₃, Pd(OAc)₂, Pd(PPh₃)₄, Pd(O), PdCl₂(dppf) y PdCl₂. Dichos catalizadores son conocidos y usados por los expertos en la técnica y, por lo tanto, sus estructuras son conocidas. En un caso preferido, el catalizador de paladio es Pd₂(dba)₃.
- 25 En un caso preferido, los procedimientos anteriores comprenden además escindir el compuesto del soporte sólido. Se apreciará fácilmente que los compuestos de la presente invención se pueden escindir fácilmente del soporte sólido mediante procedimientos estándar conocidos y usados por los expertos en la técnica. La escisión de un compuesto unido a resina y la liberación del compuesto deseado de la resina se realizan normalmente en presencia de un ácido. Los ácidos adecuados incluyen un ácido orgánico tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, cloruro de hidrógeno, etc. La reacción se lleva a cabo habitualmente en un disolvente tal como agua, un alcohol tal como metanol, etanol, 1,4-dioxano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, una mezcla de los mismos o cualquier otro disolvente que no influya adversamente en la reacción.
- 30
- 35 En otro aspecto más, el procedimiento anterior está adaptado a preparar un banco (o una selección) de restos heteroarilo estructurales. Típicamente, el banco de restos estructurales sustituidos se prepara usando una pluralidad de restos dihaloheteroarilo estructurales. Como tal, también se describe un procedimiento para la síntesis de un banco combinatorio de heteroarilos sustituidos (por ejemplo, heterociclos), procedimiento que comprende:

proporcionar una pluralidad de restos dihaloheteroarilo estructurales y capturar los restos dihaloheteroarilo estructurales en una resina mediante la sustitución nucleófila de un primer átomo de cloro por un nucleófilo de amina unido a resina).

- 5 En un caso preferido, los dos halógenos, es decir, los grupos halo, presentes en los restos dihaloheteroarilo estructurales se seleccionan independientemente e incluyen cloro, flúor, bromo y yodo. En casos preferidos en la actualidad, los dos halógenos de los restos dihaloheteroarilo estructurales son grupos cloro.

10 En un caso preferido, el procedimiento comprende además la sustitución del segundo halógeno de los restos dihaloheteroarilo estructurales mediante desplazamiento nucleófilo o, alternativamente, mediante una reacción de acoplamiento. En un caso preferido en la actualidad, se emplea una reacción de acoplamiento para llevar a cabo la sustitución del segundo halógeno de los restos dihaloheteroarilo estructurales. A este respecto, la reacción de acoplamiento es preferentemente una reacción de acoplamiento mediada por paladio.

15 Será muy evidente para los expertos en la técnica que los dos halógenos, es decir, grupos halo, de los restos dihaloheteroarilo estructurales se pueden sustituir con una serie de grupos funcionales diferentes, cada uno de los cuales se selecciona independientemente. Los grupos funcionales adecuados incluyen anilinas, fenoles, aminas y ácidos borónicos (véase la Tabla I). En un caso preferido en la actualidad, los grupos funcionales incluyen ácidos arilborónicos, anilinas y fenoles.

20 Si se desea introducir una sustitución en N9, el procedimiento comprende además realizar sustituciones iniciales anteriores a la sustitución de los primeros halógenos de los restos dihaloheteroarilo estructurales. En un caso preferido, la sustitución inicial se lleva a cabo usando una reacción que incluye reacciones de alquilación, reacciones de acilación y reacciones de acoplamiento.

25 Se pueden usar numerosos restos dihaloheteroarilo estructurales en los procedimientos anteriores. Los ejemplos de restos dihaloheteroarilo estructurales incluyen, pero sin limitación, purinas, pirimidinas, quinazolininas, pirazinas, ftalazinas, piradazinas y quinoxalinas.

30 Cuando se emplea una reacción de acoplamiento catalizada por paladio para sustituir los grupos halo de los restos dihaloheteroarilo estructurales o del grupo halo de los monohaloheteroarilos sustituidos con amina unidos a resina, la reacción de acoplamiento catalizada por paladio típicamente implica la reacción del dihaloheteroarilo o del monohaloheteroarilo sustituido con amina unido a resina con un agente de acoplamiento en presencia de un disolvente, un catalizador de paladio, una base y un ligando de carbeno o fosfina. Los agentes de acoplamiento incluyen ácidos borónicos, aminas y alcoholes. En un caso preferido actualmente, los agentes de acoplamiento adecuados incluyen ácidos arilborónicos, anilinas y fenoles. Cabe señalar que las descripciones anteriores referidas a los ligandos de carbeno o de fosfina, las bases, los disolventes, los catalizadores de paladio y los catalizadores de cobre expuestos en relación con los procedimientos de preparación de un compuesto de amina sustituido en C-2 son completamente aplicables a los procedimientos de preparación de un banco combinatorio o una selección de compuestos heteroarilo sustituidos y, por tanto, no se repetirán en la presente memoria.

2. Síntesis en fase líquida

45 La síntesis en fase líquida de los compuestos de Fórmula I implica sustituir primero 2,6-dihaloheteroarilo con una amina adecuadamente sustituida en condiciones de reacción apropiadas conocidas para los expertos en la técnica. A esto, le sigue la sustitución con una amina, anilina o alcohol arílico adecuadamente sustituidos usando un catalizador de Pd en condiciones de reacción apropiadas conocidas por los expertos en la técnica. Cabe señalar que las descripciones anteriores referidas a los ligandos de carbeno o de fosfina, las bases, los disolventes, los catalizadores de paladio que se exponen con los procedimientos de preparación de los compuestos de Fórmula I mediante un soporte sólido son completamente aplicables a los procedimientos de preparación de los compuestos de Fórmula I mediante una fase líquida y, por tanto, no se repetirán en la presente memoria.

IV. Procedimientos para inducir la desdiferenciación celular

55 Las composiciones de la presente invención se pueden usar convenientemente en procedimientos para inducir la desdiferenciación de células de mamífero. Se pone en contacto una célula de mamífero con un compuesto de Fórmula II según lo definido anteriormente (o una composición del mismo), mediante lo cual la célula de mamífero se desdiferencia en una célula madre multipotente.

60 1. Células adecuadas

65 Las células de mamífero comprometidas con un linaje adecuadas pueden ser cualquier tipo de célula comprometida con un linaje (por ejemplo, mioblastos u osteoblastos) y pueden proceder de cualquier mamífero adecuado (por ejemplo, roedores tales como, por ejemplo, ratones, ratas, cobayas y conejos; mamíferos no roedores tales como, por ejemplo, perros, gatos, cerdos, ovejas, caballos, vacas y cabras; primates tales como, por ejemplo, chimpancés y seres humanos). Las células comprometidas con un linaje pueden ser células primarias o pueden ser células

mantenidas en cultivo. Si las células se mantienen en cultivo, normalmente, están en contacto con los compuestos/las composiciones de la presente invención entre el paso 12 y 15 del cultivo. Hay procedimientos para el aislamiento y el cultivo de células humanas y de mamíferos son ampliamente conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en Humason, "ANIMAL TISSUE TECHNIQUE", IV ed., W. H. Freeman and Company (1979); Freshney *et al.*, "CULTURE OF ANIMAL CELLS" (III ed. 1994); y Ricciardelli *et al.*, (1989) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25; 1016.

2. Procedimientos generales de cultivo

10 Las células de mamífero se pueden poner en contacto con un compuesto de Fórmula I, tal como el Compuesto A, solo o con un compuesto de Fórmula I, tal como el Compuesto A, en presencia de factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos o TGF- β). Los expertos en la técnica apreciarán que es posible ajustar la cantidad de un compuesto de Fórmula I, tal como el Compuesto A, y de los factores de crecimiento para facilitar la

15 diferenciación de un determinado tipo de célula comprometida con un linaje. Típicamente, la cantidad de Compuesto A en contacto con las células es de aproximadamente 0,1 μ M (52 ng/ml) a aproximadamente 50 μ M (2,6 μ g/ml), más típicamente, de aproximadamente 0,25 μ M a aproximadamente 35 μ M, incluso más típicamente, de aproximadamente 0,5 μ M a aproximadamente 25 μ M, aún más típicamente, de aproximadamente 0,75 μ M a aproximadamente 15 μ M, más típicamente, a aproximadamente 5 μ M.

20 Este aspecto de la presente invención se basa en las técnicas habituales del campo del cultivo de células. Los procedimientos y las condiciones de cultivo celular pueden ser determinados por los expertos en la técnica, usando la metodología conocida (véase, por ejemplo, Freshney *et al.*, 1994, *supra*). En general, el medio de cultivo celular incluye la consideración de factores tales como el sustrato para el crecimiento celular, la densidad celular y el contacto celular, la fase gaseosa, el medio y la temperatura.

25 La incubación de las células se realiza generalmente en condiciones conocidas para que sea óptima para el crecimiento celular. Dichas condiciones pueden incluir, por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 37°C y una atmósfera humidificada que contenga CO₂ al aproximadamente 5%. La duración de la incubación puede variar ampliamente, dependiendo de los resultados deseados. En general, la incubación se continúa preferentemente

30 hasta que las células se expresan adecuadamente. La proliferación se determinada convenientemente mediante la incorporación de ³H o el marcaje de BrdU.

Se pueden usar placas de plástico, matraces o botellas de rodillos para cultivar células según los procedimientos de la presente invención. Los recipientes de cultivo adecuados incluyen, por ejemplo, placas de múltiples pocillos,

35 placas de Petri, tubos de cultivo de tejidos, matraces, botellas de rodillo y similares.

Las células se cultivan a densidades óptimas que se determinan empíricamente basándose en el tipo de célula. Las células se pasan típicamente 12-15 veces y se desechan tras 15 pasadas.

40 Las células cultivadas normalmente se desarrollan en una incubadora que proporciona una temperatura adecuada, por ejemplo, la temperatura corporal del animal del que se obtuvieron las células, lo que representa las variaciones regionales de la temperatura. Generalmente, 37°C es la temperatura preferida para el cultivo celular. La mayoría de las incubadoras están humidificadas en condiciones aproximadamente atmosféricas.

45 Los constituyentes importantes de la fase gaseosa son oxígeno y dióxido de carbono. Típicamente, se usan tensiones de oxígeno atmosférico para los cultivos celulares. Los recipientes de cultivo están generalmente ventilados en la atmósfera de la incubadora para permitir el intercambio de gas mediante el uso de tapas permeables al gas o mediante la prevención del sellado de los recipientes de cultivo. El dióxido de carbono desempeña un papel en la estabilización del pH, junto con el tampón en los medios celulares y está típicamente

50 presente en una concentración del 1-10% en la incubadora. La concentración de CO₂ preferida es típicamente del 5%.

Los medios celulares definidos están disponibles como polvos premezclados o soluciones pre-esterilizadas envasados. Los ejemplos de medios comúnmente usados incluyen MEM- α , DME, RPMI 1640, DMEM, medio completo de Iscove, medio de McCoy (véase, por ejemplo, GibcoBRL/Catálogo y Guía de Referencia de Life Technologies; Catálogo de Sigma). Típicamente, se usan MEM- α o DMEM en los procedimientos de la invención. Los medios de cultivo celular definidos a menudo se complementan con suero al 5-20%, típicamente, suero desactivado por calor, por ejemplo, suero de ser humano, caballo, ternera y suero bovino fetal. Típicamente, se usa suero bovino fetal al 10% en los procedimientos de la invención. El medio de cultivo generalmente se tampona para

60 mantener las células a un pH preferentemente de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,4. Otros suplementos para los medios incluyen típicamente, por ejemplo, antibióticos, aminoácidos y azúcares, y factores de crecimiento.

B. Procedimientos de diferenciación de células comprometidas con un linaje desdiferenciadas

65 Un aspecto de la presente invención proporciona procedimientos para diferenciar las células madre multipotentes derivadas de células comprometidas con un linaje. En una realización ejemplar, las células comprometidas con un

linaje (por ejemplo, mioblastos) se ponen en contacto con una composición que comprende el Compuesto A y se induce su desdiferenciación en células madre multipotentes (por ejemplo, células madre mesenquimatosas). A continuación, se induce la diferenciación de las células madre multipotentes en células comprometidas con un linaje. En el caso de las células madre mesenquimatosas multipotentes, se cultivan en condiciones que conducen a inducir la diferenciación en uno cualquiera de varios tipos de células incluyendo, por ejemplo, osteoblastos, mioblastos y miotubos, y condrocitos. Los procedimientos y los medios de cultivo para la diferenciación de células madre multipotentes en células comprometidas con un linaje son ampliamente conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6.617.159; 5.635.386; y 5.397.706.

10 La diferenciación de las células madre multipotentes en células diferenciadas se puede detectar mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, la detección de la expresión de factores de transcripción específicos del tipo de célula, la detección de la expresión de proteínas específicas del tipo de célula y la detección de cambios morfológicos en las células. Por ejemplo, los osteoblastos típicamente expresan las siguientes proteínas: fosfatasa alcalina (ALP), colágeno de tipo I, osteocalcina y osteoponina; y los siguientes factores de transcripción: *Cbfa1/Runx2*, *gsc*, *Dlx1*, *Dlx5*, *Msx1*, *Cartl*, *Hoxa1*, *Hoxa2*, *Hoxa3*, *Hoxb1*, *rae28*, *Twist*, *AP-2*, *Mfl*, *Pax1*, *Pax3*, *Pax9*, *TBX3*, *TBX4*, *TBX5* y *Brachyury* (véase, por ejemplo, Olsen *et al.*, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16:191 (2000)). Como un ejemplo adicional, los mioblastos expresan típicamente las siguientes proteínas: MyoD, Myf5, miosina, CD56 y desmina.

20 1. Detección de proteínas específicas de células

La expresión de proteínas específicas de células se puede detectar midiendo el nivel de la proteína o del ARNm específicos de la célula. Un experto en la técnica apreciará que el procedimiento particularmente usado para detectar la proteína o el ARNm específicos de la célula no es una parte fundamental de la presente invención. Los procedimientos de detección de proteínas y ARNm específicos de células son ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, el nivel de determinadas proteínas específicas de células se puede medir convenientemente usando inmunoensayos tales como tinción inmunohistoquímica, transferencia Western, ELISA y similares, con un anticuerpo que se una selectivamente a determinadas proteínas específicas de las células o un fragmento de las mismas. La detección de la proteína mediante anticuerpos específicos de la proteína en los inmunoensayos es conocida por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (1988), Coligan, "Current Protocols in Immunology" (1991); Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" (II ed. 1986); y Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975). Para la medición del ARNm, se prefieren los ensayos de amplificación, por ejemplo, PCR, LCR, o los ensayos de hibridación, por ejemplo, hibridación Northern, protección de ARNasa, transferencia de puntos. El nivel de proteína o ARNm se detecta, por ejemplo, mediante agentes de detección marcados directa o indirectamente, por ejemplo, ácidos nucleicos marcados fluorescentemente o radiactivamente, anticuerpos marcados radiactivamente o enzimáticamente. Estos ensayos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel, *et al.*, ed. "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY" (2001). En el caso de enzimas específicas de células, se puede usar la medición de la actividad enzimática (por ejemplo, de la fosfatasa alcalina) como un indicio de la diferenciación celular. Los procedimientos de medición de las enzimas celulares son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, *supra*; Coligan, 1991, *supra*; Goding, 1986, *supra*; y Kohler y Milstein, 1975, *supra*).

2. Detección de factores de transcripción específicos de células

45 La expresión de factores de transcripción específicos de células se puede detectar mediante ensayos con genes indicadores. Estos ensayos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, *supra* y la solicitud de patente estadounidense n.º 60/418.898. Por ejemplo, la expresión del factor de transcripción específico de los huesos *Cbfa1/Runx2* puede ser la detección de la osteogénesis; la expresión de los factores de transcripción específicos de los condrocitos p38 MAPK o c-Maf se puede usar para detectar la condrogénesis; y la expresión de los factores de transcripción específicos de los mioblastos Mirk (quinasa relacionada con el minicerebro)/dyrK1B or FoxO1 se puede usar para detectar la miogénesis.

Los genes indicadores tales como, por ejemplo, la cloranfenicol acetiltransferasa, la luciferasa de luciérnaga, la luciferasa bacteriana o la β -galactosidasa se pueden usar en los ensayos con genes indicadores. El constructo indicador se transfecta típicamente transitoria o establemente en una célula. La región promotora del gen relevante, típicamente, se amplifica mediante cebadores de PCR adecuados. El producto de la PCR resultante se inserta en un vector de clonación adecuado, se amplifica y se secuencia. El plásmido resultante se digiere con enzimas de restricción apropiadas y se inserta el fragmento resultante en un vector que comprende un gen indicador.

60 Para los ensayos de genes indicadores con células transfectadas de forma transitoria, típicamente, se siembran las células en una placa de 6 pocillos a una densidad de 30.000 células/pocillo en 2 ml de medio de crecimiento y se incuban durante una noche o durante un tiempo adecuado. Se transfecta el ADN de plásmido en las células usando un reactivo de transfección adecuado. Tras 8 horas, se siembran las células transfectadas en placas de ensayo de 96 pocillos (por ejemplo, Corning) y se tratan con una cantidad apropiada de un compuesto de Fórmula I (por ejemplo, el Compuesto A). Las células se incuban durante 4 días, a continuación, se analiza la actividad del gen indicador en las células mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Para los ensayos de genes indicadores con las células transfectadas de forma estable, típicamente, las células se siembran en una placa de 6 pocillos a una densidad de 30.000 células/pocillo en 2 ml de medio de crecimiento y se incuban durante una noche o durante un tiempo adecuado. Se cotransfecta una cantidad apropiada de plásmido indicador y un vector que comprende un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a un antibiótico) en las células usando un reactivo de transfección apropiado. Tras un periodo de incubación apropiado, se siembran las células en una placa de cultivo de 10 cm y se añade una cantidad apropiada de antibiótico al medio de cultivo. Se añade antibiótico recién preparado a intervalos adecuados. Se mezclan las colonias resistentes al antibiótico para obtener las células transfectadas de forma estable. Se siembran las células transfectadas en placas de ensayo de 96 pocillos (por ejemplo, Corning) y se tratan con una cantidad apropiada de un compuesto de Fórmula I (por ejemplo, el Compuesto A). Se incuban las células durante 4 días y, a continuación, se analiza la actividad del gen indicador en las células mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

3. Detección de cambios morfológicos

Los cambios morfológicos producidos en las células también son un indicio de la diferenciación celular y se pueden detectar mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Típicamente, se tiñen las células diferenciadas con un colorante adecuado y se detectan visualmente los cambios morfológicos, por ejemplo, con un microscopio. Por ejemplo, las células diferenciadas se pueden teñir con Oil Red O, que identifica la presencia de gotitas de líquido dentro de la membrana citoplasmática características de los adipocitos. Los procedimientos y las composiciones de tinción de células para identificar determinados tipos de células son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Albertine y Gee, *J. Leuk. Biol.* 59(5): 631-8 (1996); Allsopp *et al.*, *J. Immunol. Methods*, mayo de 1998; 214(1-2):175-86 (1998); Ashley *et al.*, *Leuk. Res.* 18(1):37-48 (1994); Ashley *et al.*, *Leuk. Res.* 17(10): 873-82 (1993); Boutonnat *et al.*, *C. R. Acad. Sci.* III 321(11): 901-7 (1998); Boyd *Cell Growth Differ.* 4(9):777-84 (1993); Dell'Accio *et al.*, *J. Orthop. Res.* 21 (1):123-31 (2003); Ford *et al.*, *J. Surg. Res.* 62(1):23-8 (1996); Haas *et al.*, *Acta Histochem.* 102(3): 273-80 (2000); Horan *et al.*, *Methods Cell Biol.* 33: 469-90 (1990); Khalaf *et al.*, *J. Immunol. Methods* 165(1): 121-5 (1993); Melnicoff *et al.*, *J. Leuk. Biol.* 43(5): 387-97 (1988); Modo *et al.*, *Neuroimage* 17(2):803-11 (2002); Muirhead, *Morphologie* 85:27 (2001); Parish, *Immunol. Cell Biol.* 77(6): 499-508 (1999); Pierelli *et al.*, *Methods Cell Biol.* 64(1): 153-70 (2001); Waters *et al.*, *Cytometry* 48(3):146-52 (2002); Yuan *et al.*, *Microvascular Res.* 40: 228-9 (1990); y las patentes estadounidenses n.º 6.387.326; 6.076.583; 5.700.346; 5.318.795; 4.792.521; 4.783.401; 4.762.701; y 4.859.584.

V. Procedimientos de rastreo

También se describe en la presente memoria un procedimiento de rastreo para compuestos adicionales que inducen la desdiferenciación de una célula comprometida con un linaje. Se pone en contacto una célula de mamífero comprometida con un linaje con un compuesto de prueba sospechoso de inducir la desdiferenciación de células de mamíferos comprometidas con un linaje. La desdiferenciación de las células comprometidas con un linaje se puede detectar mediante la detección de la pérdida de proteínas específicas de las células y de factores de transcripción específicos de las células como se describe anteriormente. Para determinar si las células comprometidas con un linaje se han desdiferenciado en células madre multipotentes, se cultivan las células desdiferenciadas en al menos dos medios separados de cultivo de células separados, cada uno de los cuales induce la diferenciación de células madre en diferentes tipos de células. Los ensayos para determinar si las células desdiferenciadas han experimentado la diferenciación en el primer o en el segundo tipo de célula son la conducción; y la inducción de la diferenciación de las células madre en los tipos de células identifica el compuesto de prueba como un compuesto que induce la desdiferenciación de células de mamíferos comprometidas con un linaje.

En un caso preferido, los procedimientos de rastreo de alto rendimiento implican proporcionar un banco que contiene un gran número de posibles compuestos terapéuticos (compuestos candidatos). A continuación, se rastrean dichos "bancos obtenidos por química combinatoria" en uno o más ensayos para identificar aquellos miembros del banco (especies químicas o subclases particulares) que muestran una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos líder" convencionales o se pueden usar ellos mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales.

Un banco obtenido por química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados bien mediante síntesis química o síntesis biológica combinando una serie de "componentes" químicos tales como reactivos. Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de dicha mezcla combinatoria de componentes químicos (Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37 (9):1233-1251 (1994)).

La preparación y el rastreo de los bancos de química combinatoria son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica. Dichos bancos de química combinatoria incluyen, pero sin limitación, purinas sustituidas, pirimidinas, quinazolininas, pirazinas, pirrolopirimidina, pirazolopirimidina, ftalazinas, piridazinas y quinoxalinas (véase, por ejemplo, Ding *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:1594 (2002); Gray *et al.*, *Science* 281:533 (1998); Rosania *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18:304 (2000); y Rosania *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96:4797 (1999); bancos de péptidos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.010.175, Furka, *Pept. Prot. Res.* 37:487-493 (1991), Houghton *et al.*, *Nature*, 354:84-88 (1991)); peptoides (Publicación PCT n.º WO 91/19735); péptidos codificados (publicación PCT WO 93/20242); bio-oligómeros aleatorios (publicación PCT WO 92/00091); benzodiazepinas (patente

estadounidense n.º 5.288.514); diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* EE.UU. 90:6909-6913 (1993)); polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)); peptidomiméticos no peptídicos con beta-D-Glucosa estructural (Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218 (1992)); síntesis orgánicas análogas de bancos de compuestos pequeños (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661 (1994)); oligocarbamatos (Cho, *et al.*, *Science* 261:1303 (1993)) y/o fosfonatos peptídicos (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59: 658 (1994)). Véase, en general, Gordon *et al.*, *J. Med. Chem.* 37: 1385 (1994); bancos de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang *et al.*, *Science* 274: 1520-1522 (1996) y la patente estadounidense n.º 5.593.853) y bancos de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum, C & EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides, patente estadounidense n.º 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente estadounidense n.º 5.549.974; pirrolidinas, patentes estadounidenses n.º 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, patente estadounidense n.º 5.06.337; benzodiazepinas, patente estadounidense n.º 5.288.514, los compuestos que regulan la adenil ciclase y el AMP cíclico tales como, por ejemplo, la forskolina y sus derivados, patentes estadounidenses n.º 5.789.439; 5.350.864, y 4.954.642.

15 Los dispositivos para la preparación de bancos combinatorios se encuentran disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, 357, 390 MPS MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Wobum, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA).

20 También se ha desarrollado una serie de sistemas de robótica ampliamente conocidos para las químicas en fase líquida. Estos sistemas incluyen estaciones de trabajo automáticas como el aparato de síntesis automática desarrollado por Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japón) y muchos sistemas de robótica que utilizan brazos robóticos (Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), que imitan las operaciones de síntesis manuales realizadas por un químico. Los dispositivos anteriores, con la modificación apropiada, son adecuados para su uso con la presente invención. Además, hay numerosos bancos combinatorios comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N. J., Asinex, Moscú, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO., CHEMSTAR, Ltd, Moscú, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA., Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

30 Los ensayos para identificar compuestos que inducen la desdiferenciación de células comprometidas con un linaje son adaptables a un rastreo de alto rendimiento. Los ensayos de alto rendimiento para evaluar la presencia, ausencia, cuantificación u otras propiedades de determinados ácidos nucleicos o productos proteicos son bien conocidos por los expertos en la técnica. De manera similar, los ensayos de unión y los ensayos de genes indicadores son igualmente bien conocidos. Así pues, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.559.410 describe procedimientos de rastreo de alto rendimiento para proteínas, la patente estadounidense n.º 5.585.639 describe procedimientos de rastreo de alto rendimiento para la unión de ácido nucleico (es decir, en matrices), mientras que las patentes estadounidenses n.º 5.576.220 y 5.541.061 describen procedimientos de rastreo de alto rendimiento para la unión de ligando/anticuerpo.

40 Además, los sistemas de rastreo de alto rendimiento se encuentran disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA, etc.). Estos sistemas típicamente automatizan procedimientos que incluyen pipetear muestras y reactivos, dispensar líquido, incubaciones cronometradas y lecturas finales de la microplaca en detector/es apropiados para el ensayo. Estos sistemas configurables proporcionan un alto rendimiento y una rápida puesta en marcha, así como un alto grado de flexibilidad y personalización. Los fabricantes de dichos sistemas proporcionan protocolos detallados para diversos sistemas de alto rendimiento. Así pues, por ejemplo, Zymark Corp. proporciona boletines técnicos que describen sistemas de rastreo para detectar la modulación de la transcripción de genes, unión a ligandos.

50 VI. Procedimientos de tratamiento

También se describen en la presente memoria procedimientos para tratar a individuos con enfermedades o trastornos que se pueden tratar mediante la administración de células diferenciadas. En este caso, se pone en contacto una célula de mamíferos de un linaje con un compuesto de Fórmula I (por ejemplo, el Compuesto A o una composición del mismo), tras lo que la célula de mamífero se desdiferencia en una célula madre multipotente. Luego se puede cultivar la célula madre multipotente en condiciones adecuadas para inducir la diferenciación de las células madre en una célula diferenciada de un linaje deseado (por ejemplo, una célula de un linaje de osteoblastos, una célula de un linaje de condrocitos o una célula de un linaje de adipocitos). A continuación, se administra la célula diferenciada a un individuo en necesidad de dicho tratamiento. Las células comprometidas con un linaje se pueden extraer del sujeto que se vaya a tratar, es decir, ser autólogas (y así evitar el rechazo de las células diferenciadas en base al sistema inmune), o pueden proceder de un segundo sujeto, es decir, ser heterólogas. En cualquier caso, la administración de las células se puede combinar con un tratamiento inmunosupresor adecuado.

1. Administración de células diferenciadas

65 Las células diferenciadas se pueden administrar a un sujeto mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. En un caso ejemplar, se pueden administrar osteoblastos diferenciados sobre un soporte

sólido intacto (por ejemplo, una matriz tridimensional o una superficie plana) al sujeto, por ejemplo, mediante implantación quirúrgica. Alternativamente, los osteoblastos diferenciados se pueden extraer de la matriz, es decir, mediante el tratamiento con una proteasa, antes de administrarlos al sujeto, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.

5 Las células pueden estar en formulaciones adecuadas para su administración tales como, por ejemplo, soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven isotónica la formulación con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las soluciones y suspensiones inyectables se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

15 Para la implantación quirúrgica, las células diferenciadas típicamente se dejan sobre un soporte sólido intacto, por ejemplo, una matriz tridimensional o una superficie plana. La matriz o superficie plana se implanta quirúrgicamente en el sitio apropiado en un sujeto. Por ejemplo, un paciente que necesite un injerto de hueso puede tener células diferenciadas sobre un soporte sólido intacto implantado quirúrgicamente.

20 Para determinar la cantidad eficaz de las células que se vayan a administrar en el tratamiento o la profilaxis de afecciones debidas a la disminución o la anomalía de células diferenciadas, el médico evalúa la toxicidad celular, las reacciones a los trasplantes, la progresión de la enfermedad y la producción de anticuerpos contra las células. Por ejemplo, los osteoblastos diferenciados según los procedimientos de la presente invención se pueden administrar en una cantidad eficaz para proporcionar osteoblastos al sujeto, teniendo en cuenta los efectos secundarios de los osteoblastos a diversas concentraciones, tal como se aplica al conjunto y a la salud global del paciente. La administración se puede realizar mediante dosis únicas o divididas.

25 El experto en la técnica apreciará que las células diferenciadas se pueden usar solas o en combinación con otros compuestos y regímenes terapéuticos para inducir la regeneración de tejidos (por ejemplo, osteogénesis). Por ejemplo, se puede inducir la diferenciación de las células madre en osteoblastos que se puedan administrar a un paciente junto con proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP-2, BMP-4 y BMP-7) o medicamentos antirresortivos (por ejemplo, bifosfonatos tales como, por ejemplo, alendronato sódico y risedronato de sodio; hormona tales como, por ejemplo, calcitonina y estrógenos, y moduladores selectivos del receptor de estrógenos tales como, por ejemplo, raloxifeno) que afecten al ciclo de remodelación ósea. Para evaluar el efecto de la administración de los osteoblastos en la densidad ósea, se puede tomar una medida de referencia de la densidad ósea en un individuo que vaya a recibir el tratamiento. La densidad ósea se mide periódicamente a intervalos adecuados durante y tras la administración de los compuestos de Fórmula I, por ejemplo, del compuesto A. Los procedimientos y dispositivos para medir la densidad ósea son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6.436.042; 6.405.068; 6.320.931; 6.302.582; 6.246.745; 6.230.036; 6.213.934; 6.102.567; 6.058.157; 5.898.753; 5.891.033; 5.852.647; 5.817.020; 5.782.763; 5.778.045; 5.749.363; 5.745.544; 5.715.820; 5.712.892; 5.572.998 y 5.480.439.

40 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención reivindicada.

45 **Ejemplo 1: Síntesis y caracterización del Compuesto A**

El ligando de fosfina para el acoplamiento catalizado por Pd se adquirió en Strem Chemicals. El resto de los compuestos químicos se adquirieron en Aldrich.

50 ***Síntesis en fase líquida de 2-(4-morfolinoanilín)-6-ciclohexilpurina (Compuesto A)***

Se sintetizó 2-(4-morfolinoanilín)-6-ciclohexilamino-purina (es decir, reversina o Compuesto A) usando los procedimientos similares a los descritos previamente en Ding *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:1594 (2002). A una solución de 2-fluoro-6-cloropurina (87 mg, 0,5 mmol) en *n*-butanol (5 ml), se añadió ciclohexilamina (58 µl, 0,5 mmol) y diisopropiletilamina (100 µl, 0,6 mmol). Se calentó la mezcla hasta 80°C con agitación vigorosa durante 12 horas. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se usó el producto en bruto directamente en la reacción de la siguiente etapa sin purificación adicional. Se disolvió la 2-fluoro-6-ciclohexilamino-purina en bruto (0,5 mmol) en etanol (1 ml), tras lo que se añadió 4-morfolinoanilina (178 mg, 1,0 mmol). Se calentó la mezcla hasta 75°C en un tubo cerrado herméticamente con agitación vigorosa durante 24 horas. Luego se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el material en bruto directamente mediante cromatografía de desorción súbita, proporcionando 2-(4-morfolinoanilín)-6-ciclohexilamino-purina en forma de un sólido de color blanco pálido (130 mg, 67% de rendimiento global). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 1,14-1,24 (m, 1H), 1,26-1,39 (m, 4H), 1,59-1,67 (m, 1H), 1,73-1,81 (m, 2H), 1,94-1,99 (m, 2H), 3,07 (dd, *J* = 4,8; 4,7 Hz, 4H), 3,74 (dd, *J* = 4,8; 4,7 Hz, 4H), 3,90-4,06 (m, 2H), 6,93 (d, *J* = 9,1 Hz, 2H), 7,51 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,38 (sa, 1H), 9,68 (sa, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ 26,1; 26,5; 33,4; 40,4; 52,1; 67,4; 116,5; 118,6; 124,9; 133,2; 141,8; 147,9; 148,6; 152,9; 153,3; MALDI-FTMS para C₂₁H₂₈N₇O (MH⁺): calcd.: 394,2350; encontrada. 394,2341.

Ejemplo 2: Materiales y procedimientos

Cultivo celular y rastreo de moléculas pequeñas. Se cultivan células C2C12 (ATCC CRL-1772) en DMEM (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10% (HyClone) a 37°C en CO₂ al 5%. La célula C2C12 murina es un mioblasto comprometido con un linaje biogénico. Tras la retirada del suero, se pueden diferenciar células C2C12 confluyentes y fusionarlas en miotubos multinucleados característicos.

Para el rastreo de moléculas pequeñas, se siembran células C2C12 proliferantes en placas de cultivo de tejidos de 384 pocillos (Greiner) a una densidad de 1.000 células/pocillo en DMEM con SBF al 10%. Se añaden los compuestos de prueba (es decir, las moléculas pequeñas) a una concentración final de 5µM tras 16 horas (es decir, el punto temporal en el que, típicamente, las células se adhieren a la parte inferior de una placa de cultivo de tejidos). Tras tratar las células con compuestos de prueba durante cuatro días, se retira el compuesto de prueba y se cambia el medio de cultivo celular por medio de diferenciación osteogénica (MDO), que contiene 50 µg/ml de 2-fosfato de ácido ascórbico, dexametasona 0,1µM y β-glicerofosfato 10mM. Típicamente, se cambia el medio de cultivo celular cada dos días. Tras siete días más de cultivo en MDO, se retira el MDO y se lisan las células mediante incubación en 10 µl de tampón de lisis pasiva (Promega) durante 10 min, tras lo que se añaden 10 µl de sustrato de fosfatasa alcalina (AttoPhos, Promega). Tras una incubación a temperatura ambiente de 15 minutos, se lee la intensidad de la fluorescencia en un Acquest (Molecular Devices) según las instrucciones del fabricante.

Ensayos de osteogénesis. Se tratan las células de mamífero (por ejemplo, mioblastos C2C12) con una cantidad adecuada de un compuesto de prueba (por ejemplo, reversina 5µM) en DMEM complementado con SBF al 10% durante cuatro días. Entonces, se retira el compuesto y se cambia el medio MDO cada dos días. Tras siete días de la inducción de la osteogénesis, se lavan las células con PBS (200 µl, 3 veces) y se fijan con solución de formalina al 10% (Sigma) durante 20 min. A continuación, se lavan las células fijadas con PBS (200 µl, 3 veces) y se tiñen con el kit de tinción de fosfatasa alcalina 86R (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Se toman imágenes en un microscopio Nikon Eclipse TE2000 de 200 aumentos.

Ensayos de adipogénesis. Se tratan células de mamífero (por ejemplo, mioblastos C2C12) con una cantidad adecuada de un compuesto de prueba (por ejemplo, reversina 0,5 µM) en DMEM complementado con SBF al 10% durante cuatro días. Entonces, se retiró el compuesto y se cambió el medio a medio de diferenciación adipogénica (MDA) que contenía 3-isobutil-1-metilxantina 0,5mM, 2,5 µg/ml de insulina y dexametasona 0,5µM. Típicamente, se reemplaza el MDA cada dos días. Tras siete días de la inducción de la adipogénesis, se lavan las células con PBS (200 µl, 3 veces) y se fijan con solución de formalina al 10% (Sigma) durante 10 min. A continuación, se lavan las células fijadas con PBS (200 µl, 3 veces) y se tiñen con Oil Red O al 0,7% (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Se toman imágenes en un microscopio Nikon Eclipse TE2000 de 200 aumentos.

Ejemplo 3: Identificación del Compuesto A como un compuesto con actividad inductora de la desdiferenciación celular

Se examinó un banco combinatorio de heterociclos de aproximadamente 50.000 compuestos diseñado en torno a un gran número de estructuras dirigidas por quinazinas, incluyendo purinas sustituidas, pirimidinas, quinazolininas, pirazinas, pirrolopirimidina, pirazolopirimidina, ftalazinas, piridazinas y quinoxalinas, para identificar pequeñas moléculas con actividad inductora de la desdiferenciación (véase, por ejemplo, Ding *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:1594 (2002); Gray *et al.*, *Science* 281:533 (1998); Rosania *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18:304 (2000); y Rosania *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96:4797 (1999).

Para identificar las moléculas que inducen la desdiferenciación de las células de mamífero, se diseñó un ensayo basado en la noción de que los mioblastos invertidos a un linaje deben recuperar la multipotencia, es decir, deben adquirir la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares no permitidos cuando se exponen a condiciones que normalmente provocan la diferenciación de células progenitoras mesenquimatosas multipotentes en adipocitos, osteoblastos o condrocitos. Se seleccionó la formación de osteoblastos para el rastreo principal, ya que se establecen condiciones inductoras osteogénicas y existe un ensayo de alto rendimiento para detectar el marcador específico de los huesos, la fosfatasa alcalina (ALP o ALK) (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:14520-14521 (2002)).

Se usó un protocolo de rastreo dos etapas. Inicialmente, se trataron los mioblastos C2C12 con las moléculas pequeñas durante cuatro días para inducir la diferenciación, y luego se analizó su capacidad para experimentar la osteogénesis tras la adición de agentes inductores osteogénicos conocidos. Para llevar a cabo el rastreo, se sembraron células C2C12 en placas de 384 pocillos en medio de crecimiento (DMEM con suero bovino fetal al 10%) y, tras incubar durante una noche (durante la cual las células se adhieren a la parte inferior de la placa), se añadieron 5µM de compuesto. Tras cuatro días, se retiró el compuesto y se cambió el medio a un medio inductor osteogénico (ver, por ejemplo, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:1594-1596 (2002)) que contenía 50 µg/ml de 2-fosfato de ácido ascórbico, dexametasona 0,1µM y β-glicerofosfato 10mM. Se mantuvo el cultivo durante otros siete días, se lisaron las células y se analizó su actividad ALP usando el sustrato fluorogénico 2'-[2'-benzotiazolil]-6'-hidroxibenzotiazol-fosfato (BBTP).

Entre una serie de análogos de purina 2,6-disustituida identificados en el rastreo principal, se descubrió un análogo de 2-(4-morfolinoanilín)-6-ciclohexilamino-purina (es decir, el Compuesto A o reversina, Figura 2) que indujo el nivel más alto (7 veces) de actividad ALP en relación con el tratamiento de control de DMSO. Al cuarto día de tratamiento con el compuesto, se observaron diferencias notables entre las células tratadas con reversina y las no tratadas. En las células de control (tratadas únicamente con DMSO), se formaron miotubos multinucleados por todo el cultivo. Por el contrario, la formación de miotubos se inhibió completamente en presencia de reversina 5µM y las células siguieron creciendo hasta formar un cultivo confluyente de células mononucleadas. Además, los marcadores específicos miogénicos tales como MyoD y miosina comenzaron a desaparecer. Estos resultados sugieren que la reversina no actúa simplemente como una toxina selectiva (véase, por ejemplo, Grigoriadis *et al.*, *J. Cell Biol.* 106:2139-2151 (1988)).

Ejemplo 4: Las células adquieren multipotencia tras el tratamiento con reversina

Para confirmar que los resultados no se debían a la transdiferenciación de células miogénicas en células osteogénicas, se analizaron los compuestos del rastreo principal para determinar (1) si pueden inducir la osteogénesis en ausencia del cóctel inductor de la osteogénesis y si (2) las células tratadas con compuestos pueden diferenciarse en adipocitos en condiciones que inducen la adipogénesis (véase, por ejemplo, Jaiswal *et al.*, *J. Cell. Biochem.* 64:295-312 (1997)). Tras cuatro días de tratamiento con reversina, se retiró el compuesto y, a continuación, se cultivaron las células en medio de diferenciación osteogénica (MDO) o medio de diferenciación adipogénica (MDA). Al final del día siete, en condiciones de MDO, el 35% de las células se tiñó positivamente para la ALP. Del mismo modo, cuando se expusieron a condiciones de MDA, el 40% de las células resultó tener la morfología característica de las células de grasa, gotitas de aceite dentro de la membrana citoplásmica, y se tiñeron positivamente con Oil Red O. Una vez más, en el cultivo de control, las células C2C12 confluentes siguieron formando miotubos y no se vieron afectadas por las condiciones de MDO y MDA. Estos resultados demuestran claramente que los mioblastos C2C12 comprometidos con un linaje tratados con reversina recuperan la multipotencia. Además, a la concentración eficaz de la reversina (0,5-5µM), no se observó muerte celular significativa.

Además, no se observó la transdiferenciación de mioblastos C2C12 en osteoblastos ni adipocitos en las condiciones usadas para inducir la osteogénesis o la adipogénesis. En ausencia de MDO, la reversina sola no tiene actividad osteogénica. Del mismo modo, en ausencia de MDA, la reversina sola no tiene una actividad adipogénica. Estas observaciones confirman que la reversina induce la desdiferenciación de las células C2C12 en lugar de la transdiferenciación en un linaje osteogénico. Estas observaciones también confirman que la reversina actúa como un agente inductor de la desdiferenciación en lugar de enriquecer simplemente cierto tipo de células progenitoras mediante la destrucción selectiva de mioblastos.

Ejemplo 5: Análisis clonal de C2C12

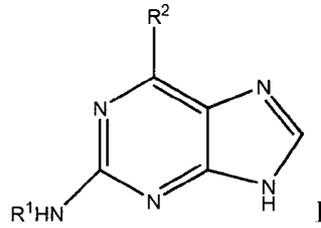
El análisis clonal se usa para verificar que la reversina puede inducir la desdiferenciación al nivel de células individuales. Se cultivaron células C2C12 a partir de una sola célula y se trataron con reversina. Tras 6 días de tratamiento, se dividió cada colonia en dos porciones. Una porción se cultivó en MDO y la otra porción se cultivó en MDA. A continuación, se analizaron las células usando los ensayos de tinción descritos en el Ejemplo 1, y se determinó que 56 de las 97 colonias eran multipotentes.

Ejemplo 6: Análisis de la estructura y la actividad de la reversina

Un análisis preliminar de la relación entre la estructura y la actividad (SAR) de los datos del rastreo principal reveló que tanto la sustitución de N9-H como de NH en la posición C2 del anillo de purina son de una importancia fundamental (la eliminación de cualquiera de ellas inhibió completamente la actividad). Sin embargo, las aminas primarias de la posición C6 del anillo de purina se pueden sustituir con varios heteroátomos tales como, por ejemplo, oxígeno y azufre sin que se produzca una pérdida de la actividad, lo que sugiere que no es necesario un donante de enlaces de H en esta posición. Sólo se puede tolerar un grupo limitado de sustituyentes aromáticos en la posición C2 del anillo de purina y se requiere un aceptor de enlaces de H en el anillo aromático.

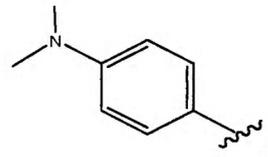
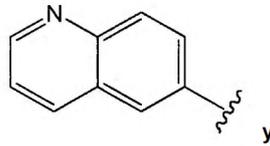
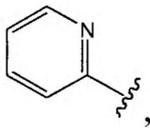
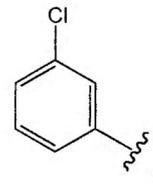
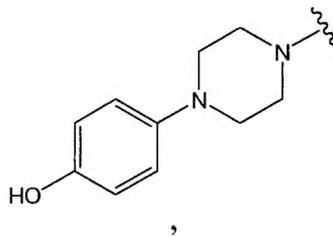
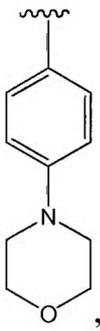
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I que tiene la siguiente estructura:

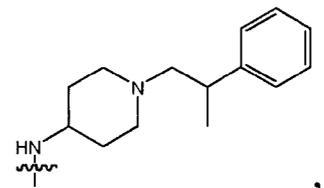
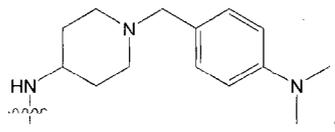
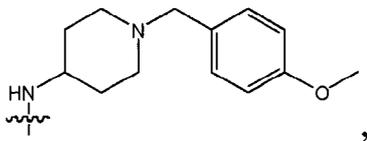


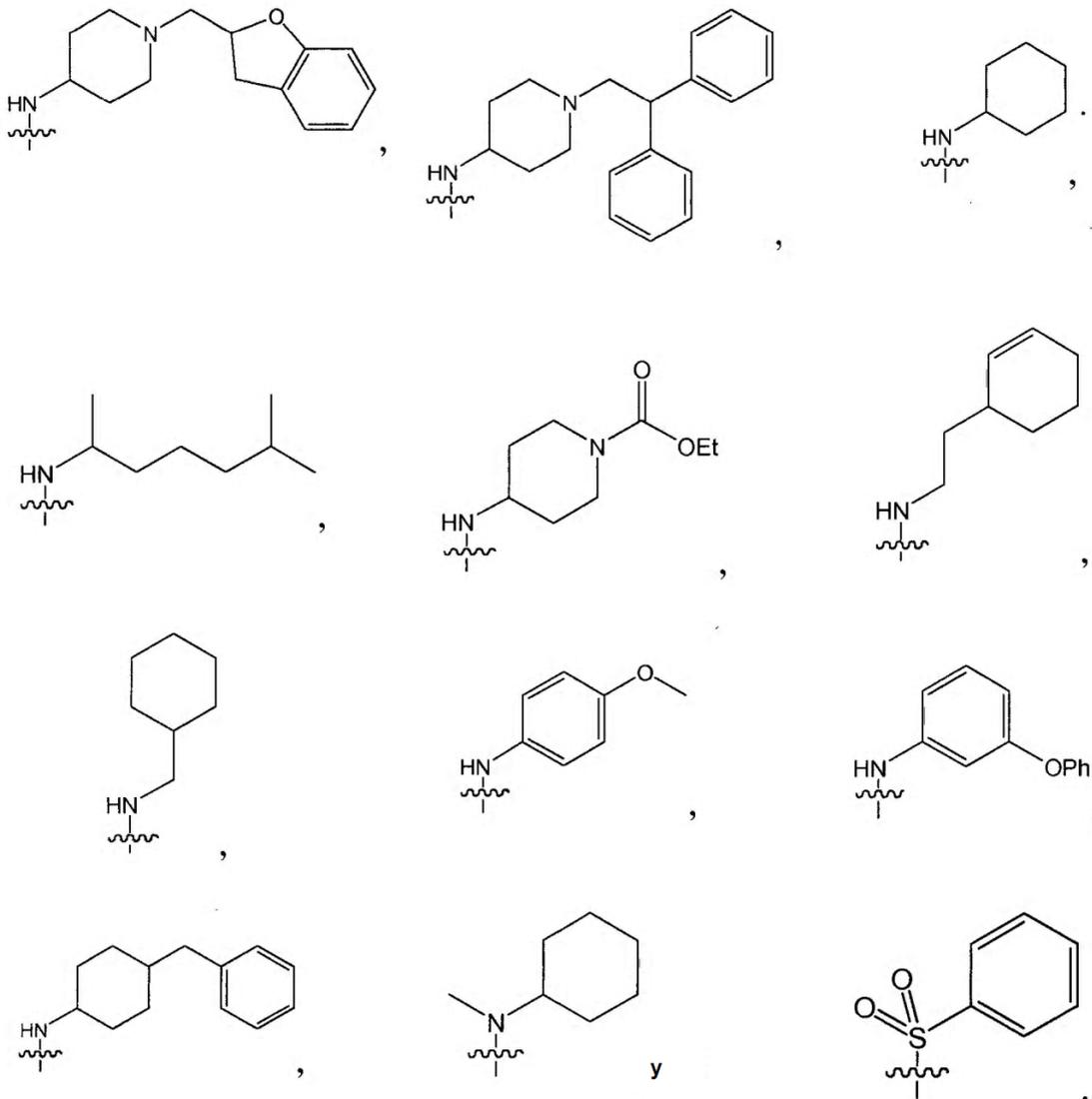
5 en la que:

R¹ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

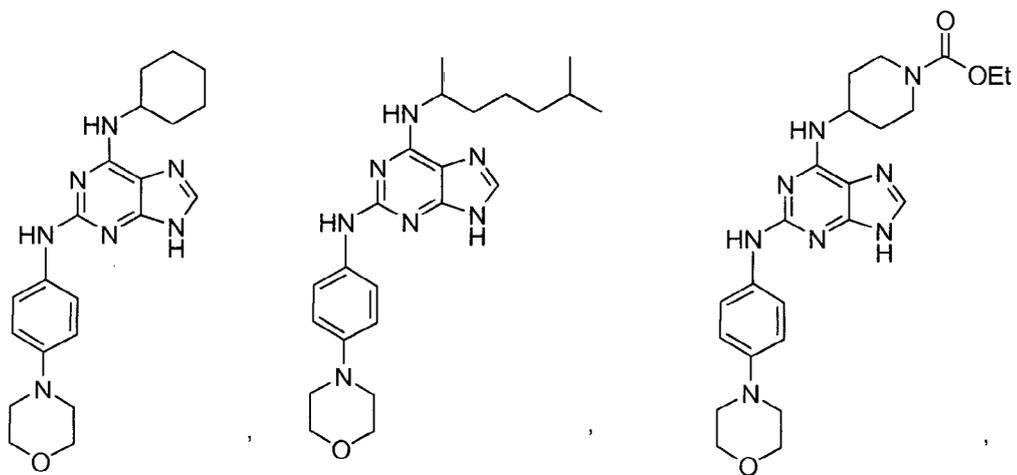
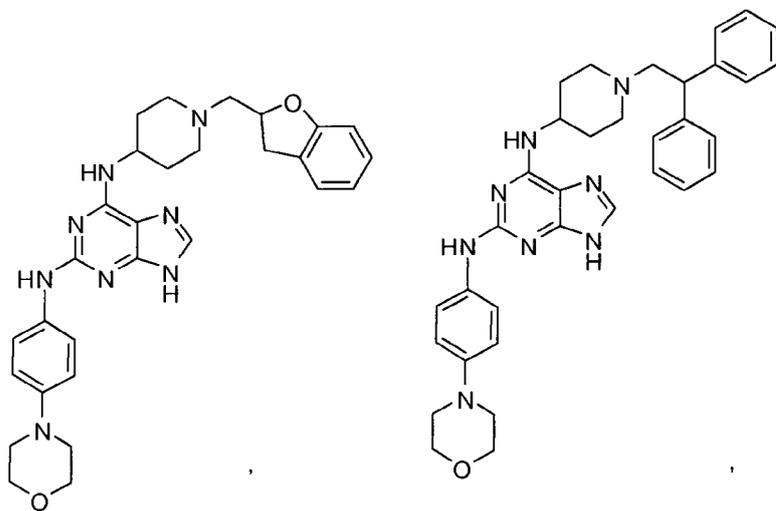
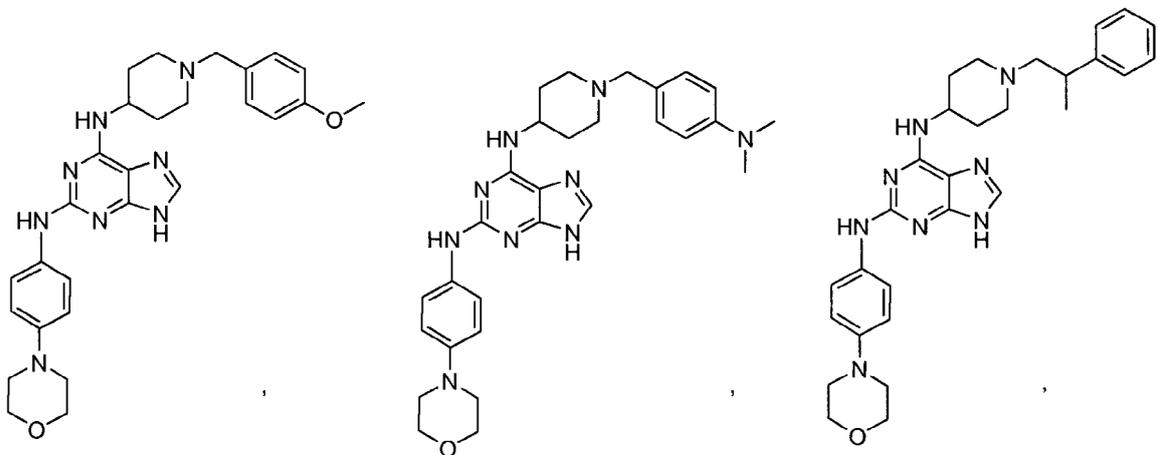


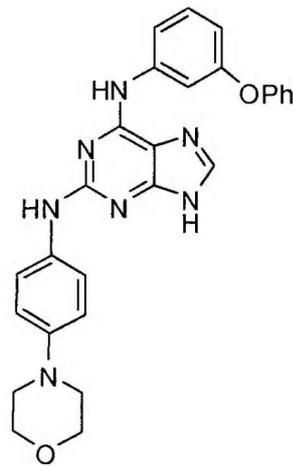
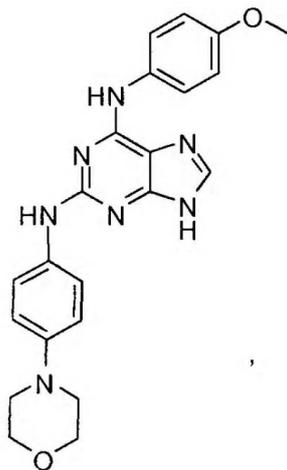
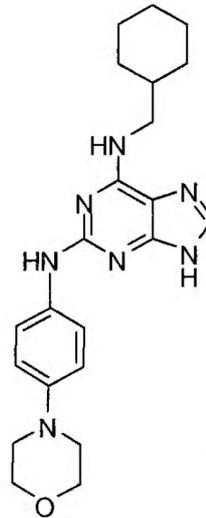
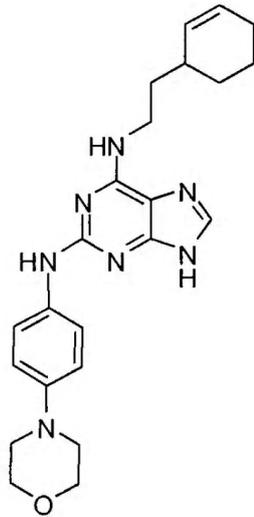
10 y R² es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:





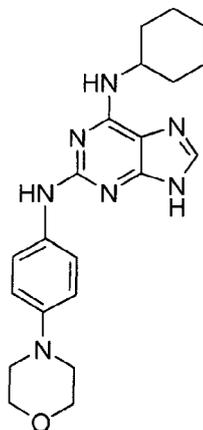
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:





y

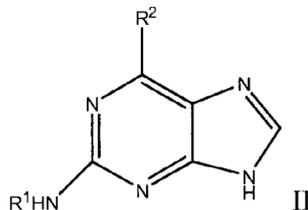
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es:



5 4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

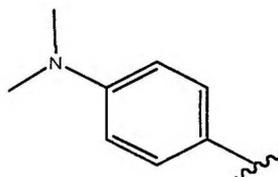
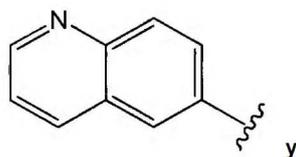
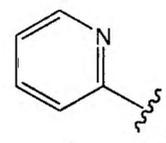
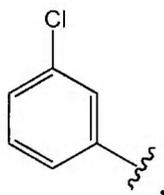
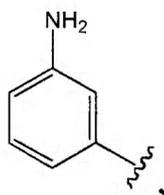
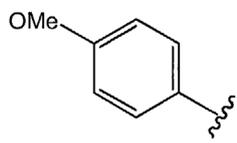
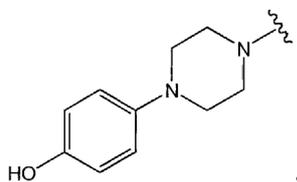
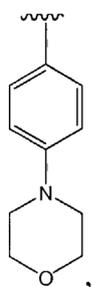
5. Un procedimiento para inducir la desdiferenciación de una célula comprometida con un linaje *ex vivo*, procedimiento que comprende:

- 5 poner en contacto una célula de mamífero comprometida con un linaje con un compuesto de Fórmula II que tiene la siguiente estructura:



en la que:

- 10 R¹ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:



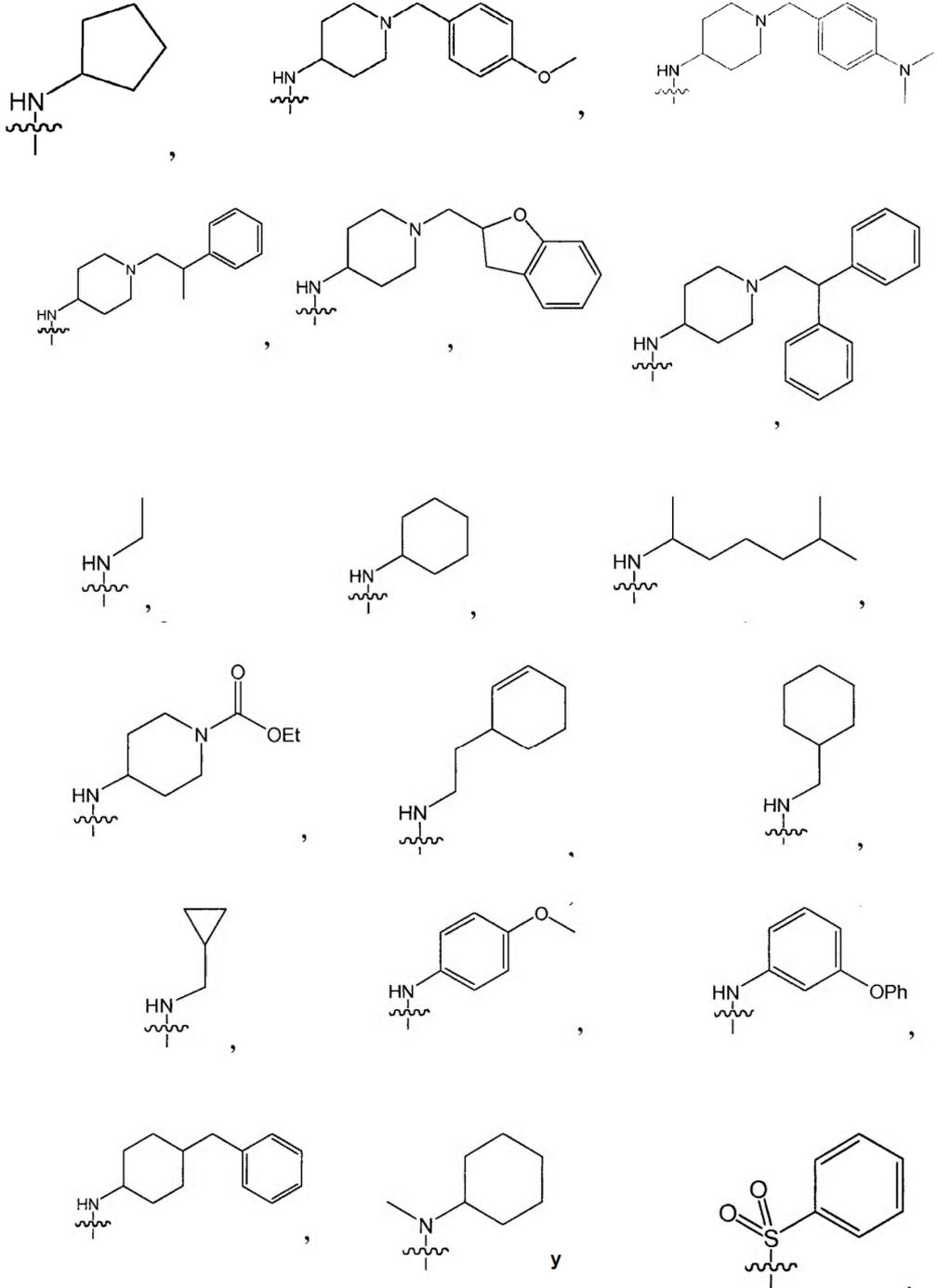
- 15 R² es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno y -L-R³;
 L es un miembro seleccionado del grupo que consiste en -O-, -S- y -NR⁴-, en el que R⁴ es H, o R⁴ se toma opcionalmente junto con R³ y el nitrógeno al que ambos están unidos para formar un heterociclo opcionalmente sustituido con alquilo C₁₋₄;
 R³ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₁₋₄,
 20 cicloalquilo C₃₋₈ y alquilarilo C₀₋₂ sustituido con 0-2 grupos R^{3a} que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxilo C₁₋₄, -N(R^{3b}, R^{3b}), -SO₂N(R^{3b}, R^{3b}), -C(O)N(R^{3b}, R^{3b}) y -O-arilo, o cuando dichos grupos R^{3a} están en átomos adyacentes del anillo, opcionalmente, se toman conjuntamente para formar un miembro seleccionado del grupo que consiste en -O-(CH₂)₁₋₂-O-, -O-C(CH₃)₂CH₂- y -(CH₂)₃₋₄; y cada grupo R^{3b} es un miembro que se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁₋₄,
 25 mediante lo que la célula comprometida con el linaje se desdiferencia en una célula madre multipotente.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que R^2 es $-L-R^3$.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que es $-NR^4-$, en el que R^4 es hidrógeno y R^3 es cicloalquilo C_{3-8} .

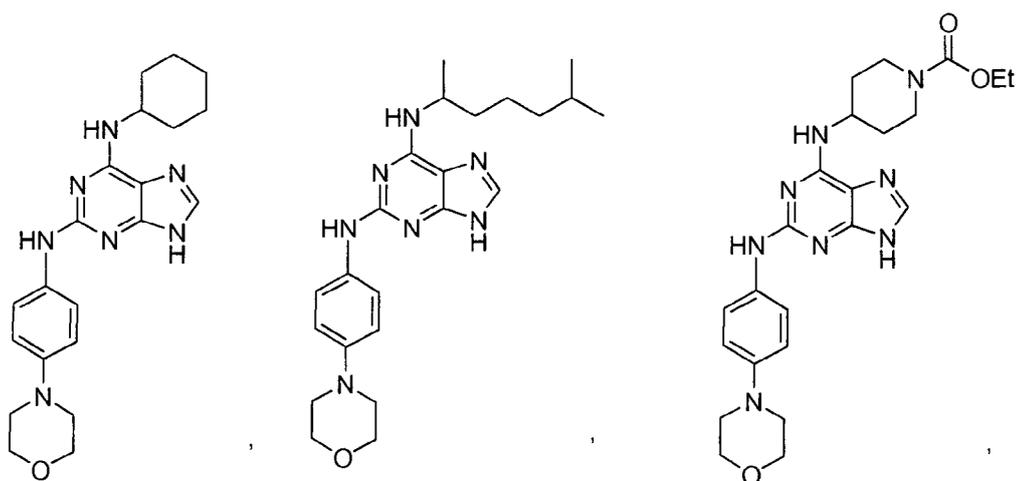
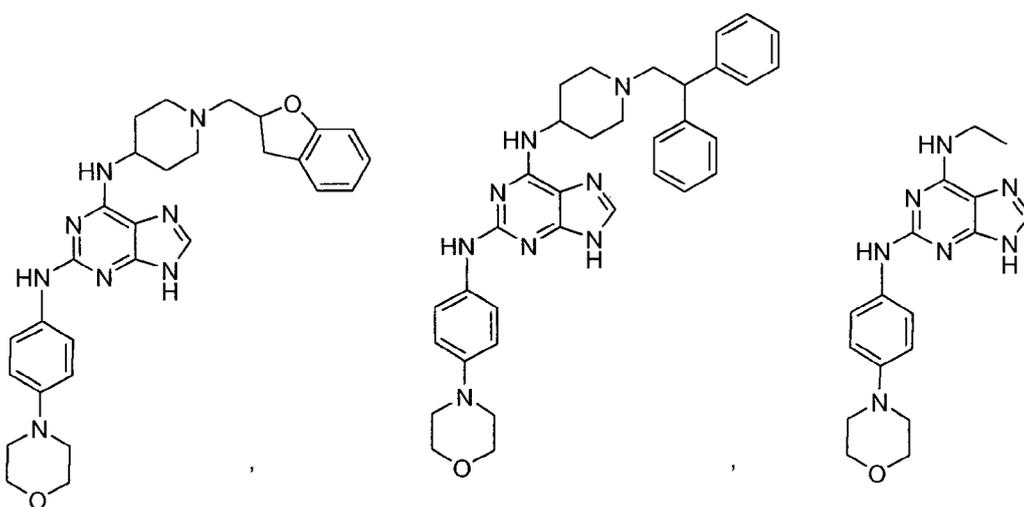
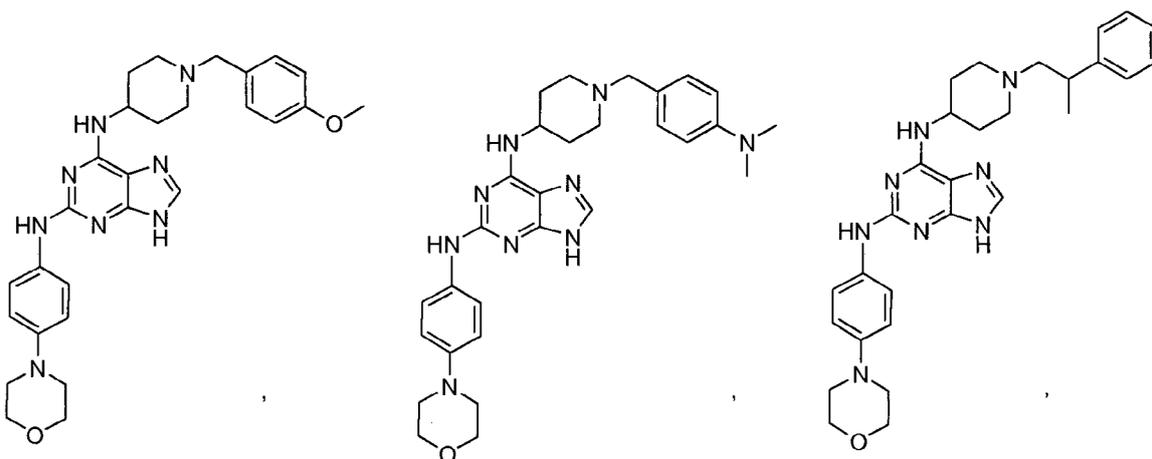
5 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que R^3 es ciclohexilo.

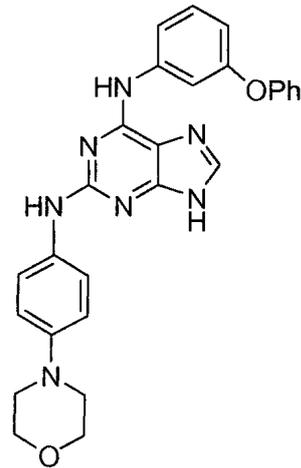
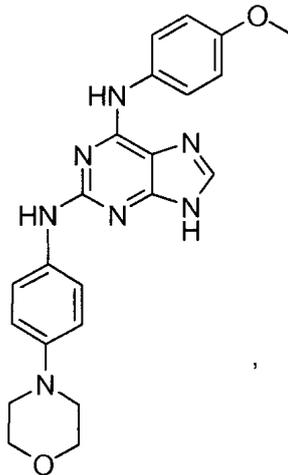
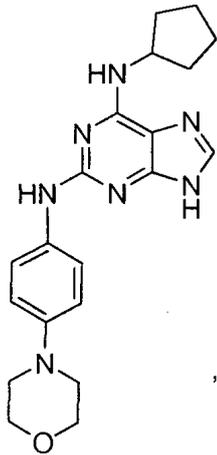
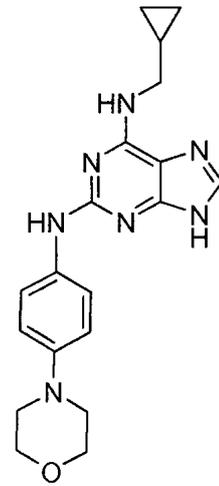
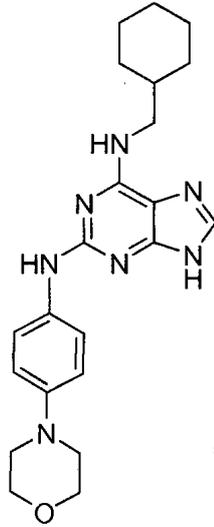
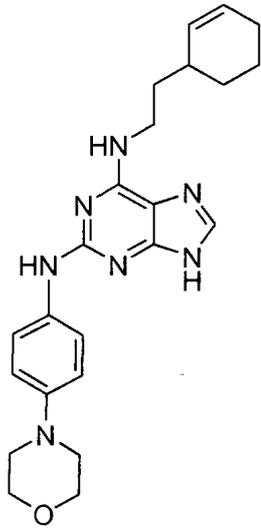
9. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que R^2 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:



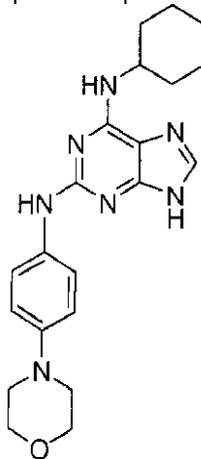
10

10. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho compuesto es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:





11. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el compuesto es:



- 5
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, que comprende además detectar la desdiferenciación de la célula de mamífero en una célula madre multipotente.
- 10 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, mediante el cual la diferenciación de la célula de mamífero comprometida con un linaje en una célula madre multipotente se detecta mediante la detección de la

pérdida de expresión de un gen marcador expresado por la célula de mamífero comprometida con el linaje.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicha célula comprometida con un linaje es un mioblasto.
- 5 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el gen marcador es un miembro seleccionado del grupo que consiste en: MyoD, Myf5, miosina, CD56 y desmina.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el mioblasto se aísla de un ratón.
- 10 17. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el mioblasto se aísla de un primate.
18. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el primate es un ser humano.
- 15 19. Un procedimiento para producir una célula de un linaje de osteoblastos a partir de una célula comprometida con el linaje, procedimiento que comprende:
 - (a) poner en contacto una célula comprometida con el linaje con un compuesto según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, mediante lo que la célula comprometida con el linaje se desdiferencia en una célula madre multipotente; y
 - 20 (b) poner en contacto la célula madre multipotente con un medio de cultivo celular que induzca la diferenciación de la célula madre multipotente en una célula de un linaje de osteoblastos.

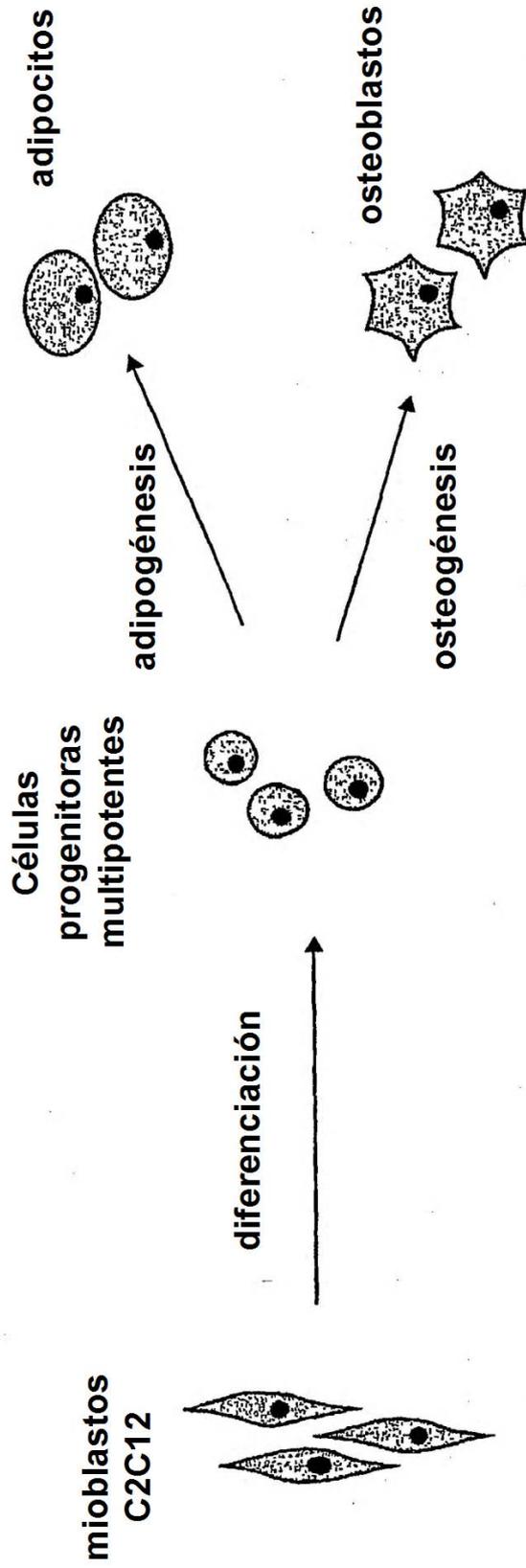


FIG. 1

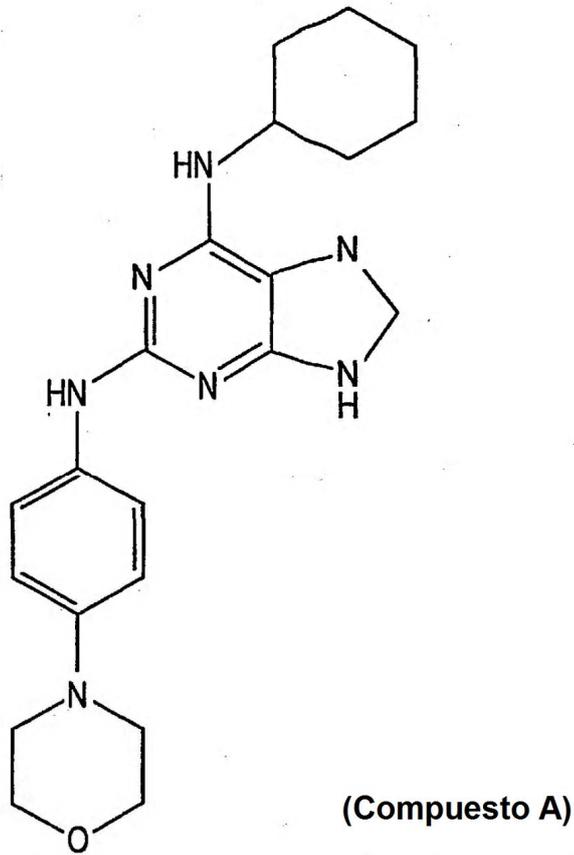


FIG. 2