

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 040**

51 Int. Cl.:

C07D 513/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2009 E 09831108 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2370445**

54 Título: **Cultivos de células madre**

30 Prioridad:

03.12.2008 US 200808 P

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

01.09.2014

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
Mail Drop TPC-8 10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**XU, YUE y
DING, SHENG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 489 040 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

Cultivos de células madre

5 Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad del documento de Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/200.808, presentado el 3 de diciembre de 2008, que se incorpora en su totalidad en el presente documento para todos los fines.

10

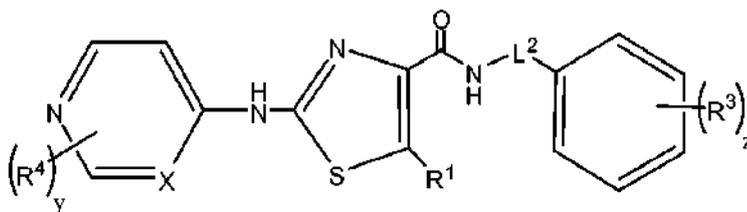
Antecedentes de la invención

Las células madre embrionarias (ESCs) son células pluripotentes que tienen la capacidad de autorrenovarse indefinidamente y de diferenciarse en todos los tipos de células del organismo (Thomson, J.A. *et al.*, Science 282 (5391): 1145-1147 (1998); Thomson, J.A. y Odorico, J.S., Trends Biotechnol 18 (2): 53-57 (2000)). Esta capacidad proporciona la esperanza de que las ESC se usen un día para reemplazar las células perdidas y dañadas, y proporcionen terapias fuera del alcance de los fármacos convencionales. Sin embargo, para llevar a cabo completamente los potenciales clínicos de las hESC, se tienen que establecer condiciones de cultivo definidas químicamente, libres de alimentadores y productos animales, y sólidas. Aunque se ha informado de varios medios definidos químicamente (Yao, S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (18): 6907-6912 (2006); Lu, J. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (15): 5688-5693 (2006); Ludwig, T.E. *et al.*, Nat Biotechnol 24 (2): 185-187 (2006)), aún son en gran medida insatisfactorios debido al rendimiento subóptimo de las células en los mismos. Especialmente en estas condiciones, cuando las células se pasan a células individuales por tripsinización, experimentan una considerable muerte celular. Se conocen diversas rutas de señalización que median la autorrenovación de las hESC, incluyendo FGF, TGF-p, Wnt, etc. (James, D. *et al.*, Development 132 (6): 1273-1282 (2005); Xu, R.H. *et al.*, Nat Methods 2 (3): 185-190 (2005); Beattie, G.M. *et al.*, Stem Cells 23 (4): 489-495 (2005); Greber, B., Lehrach, H., y Adjaye, J., Stem Cells 25 (2): 455-464 (2007); Sato, N. *et al.*, Nat Med 10 (1): 55-63 (2004)). Sin embargo, ninguna de ellas parece actuar como factor de supervivencia en este proceso, siendo difícil de conseguir el mecanismo molecular de las mismas.

30

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



(II)

35

donde, L₂ es alquileo C₁-C₆ sin sustituir; y es un número entero de 0 a 3; z es un número entero de 0 a 5; X es -N=, -CH= o -CR⁵=; R¹ es hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -OR¹⁸, y R¹⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀ sin sustituir; R⁴ y R⁵ son independientemente CN, S(O)_nR⁶, NR⁷R⁸, C(O)R⁹, NR¹⁰-C(O)R¹¹, NR¹²-C(O)-OR¹³, -C(O)NR¹⁴R¹⁵, -NR¹⁶S(O)₂R¹⁷, -OR¹⁸, -S(O)₂NR¹⁹, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir, donde n es un número entero de 0 a 2;

40

y R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷ y R¹⁹ son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir; o un racemato, diastereómero, tautómero, o un isómero geométrico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50

En algunas realizaciones, L² es metileno.

En algunas realizaciones, X es -N= o -CH=.

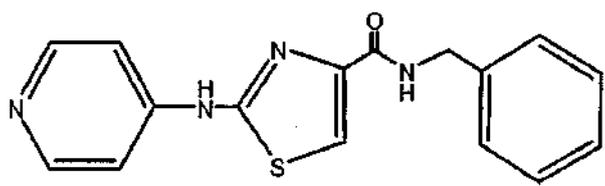
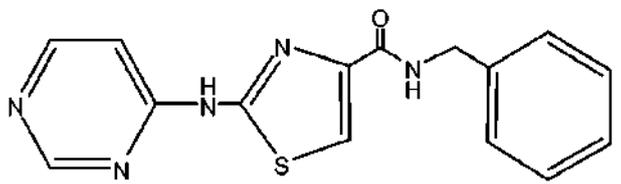
En algunas realizaciones, z es 1.

55

En algunas realizaciones, y es 0 o 1.

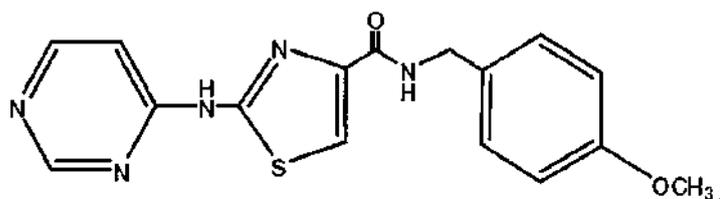
En algunas realizaciones, L² es metileno; X es -N= o -CH=; R¹ es hidrógeno; e y z son 0.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene la fórmula:



5

o



10

La presente invención también proporciona un método para estabilizar una célula animal aislada *in vitro*, comprendiendo el método poner el contacto una célula animal con una cantidad suficiente de un compuesto de fórmula II para estabilizar la célula

15 En algunas realizaciones, el método comprende además cambiar las condiciones o el entorno de la célula en presencia del compuesto, donde la etapa de cambio en ausencia del compuesto podría dar como resultado un cambio en la programación celular de la célula. En algunas realizaciones, la etapa de cambio comprende al menos uno de descongelar las células y disociar las células de otras células.

20 En algunas realizaciones, la célula es adherente. En algunas realizaciones, la célula está en suspensión.

En algunas realizaciones, el método comprende además determinar un fenotipo de la célula.

25 En algunas realizaciones, el método comprende aislar las células de un animal. En algunas realizaciones, el animal es un ser humano. En algunas realizaciones, el animal es un animal no humano.

30 La presente invención también proporciona un método para mantener la supervivencia celular, comprendiendo el método generar células madre aisladas; e inducir la estabilización de E-cadherina en las células aisladas, poniendo en contacto las células madre aisladas con una cantidad de un compuesto de fórmula II suficiente para mejorar la supervivencia de las células madre aisladas al menos 2 veces cuando se compara con la ausencia del compuesto, manteniendo de ese modo la supervivencia celular.

35 La presente invención también proporciona una población de células aisladas que comprende una cantidad de un compuesto de fórmula II suficiente para mejorar la supervivencia de las células aisladas al menos 2 veces cuando se compara con la ausencia de la molécula.

En algunas realizaciones, las células se seleccionan entre el grupo que consiste en células madre, células madre inducidas, células madre pluripotentes, células precursoras, células diferenciadas, células beta y fibroblastos.

40 DEFINICIONES

Las abreviaturas que se usan en el presente documento tienen su significado convencional dentro de las técnicas químicas y biológicas.

La expresión "estabilizar la célula" se refiere a reducir básicamente o eliminar la respuesta de una célula a un cambio en las condiciones o el entorno al que está expuesta la célula. En este contexto, "reducir básicamente" significa que la respuesta es al menos un 50 % menor que la que se produciría en ausencia de un componente estabilizante (por ejemplo, los compuestos de la invención).

5 La expresión "cambiar las condiciones o el entorno de una célula" se refiere a cambiar la temperatura, los medios de cultivo (por ejemplo, fuente de carbono, concentración salina, factor de crecimiento), disociar las células en células aisladas, descongelar las células, o cambiar de otro modo un factor de un entorno inmediato de la célula. Tal como se analiza en el presente documento, cambiar las condiciones o el entorno de una célula a menudo cambia el fenotipo de la célula o la programación celular. Por ejemplo, las células madre, así como otras células, cuando se aíslan se diferenciarán y/o morirán en respuesta a ciertos cambios tales como aislamiento, descongelación, etc. Por lo tanto, cambiar las condiciones puede reducir o eliminar la viabilidad celular mientras que las células estabilizadas como se describen en el presente documento no ven básicamente reducida la viabilidad con los mismos cambios de condiciones. El cambio en la programación de la célula también se puede monitorizar como la respuesta de la célula a un estímulo específico y es característico para un cierto tipo de célula y/o como la expresión de uno o un conjunto de genes característicos o productos génicos. A modo de ejemplo no limitante, se conoce que las células madre pluripotentes humanas expresan al menos alguno, y opcionalmente todos, los marcadores de la siguiente lista: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, ALP, Sox2, E-cadherina, UTF-1, Oct4, Rex1, y Nanog. Tal expresión puede cambiar a medida que una célula madre pierde pluripotencia o se diferencia de otro modo. Una célula madre pluripotente humana estabilizada debería mantener su patrón de expresión característico después de un cambio de condiciones.

Una célula "aislada" ha sido separada básicamente o purificada de otras células de un organismo.

25 El término "disociar" células se refiere a un proceso de aislamiento de células de otras células o de una superficie (por ejemplo, la superficie de una placa de cultivo). Por ejemplo, las células se pueden disociar de un animal o tejido mediante métodos mecánicos o enzimáticos. Alternativamente, las células que se agregan *in vitro* se pueden disociar entre sí. En otra alternativa más, las células adherentes se disocian de una placa de cultivo u otra superficie. La disociación puede implicar de ese modo romper las interacciones celulares con la matriz extracelular (ECM) y los sustratos (por ejemplo, superficies de cultivo) o romper la ECM entre células.

"Determinar un fenotipo de una célula" se refiere a evaluar la calidad o características de la célula. Los fenotipos pueden incluir, por ejemplo, expresión génica característica de un tipo celular, o patrones de expresión génica, respuesta de la célula a un estímulo o entorno, capacidad de diferenciarse o desdiferenciarse, tener una morfología particular, etc.

40 Cuando se especifican grupos sustituyentes químicos en sus fórmulas químicas convencionales, escritos de izquierda a derecha, incluyen por igual los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ es equivalente a $-\text{OCH}_2-$.

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique de otro modo, una cadena lineal (es decir, sin ramificar) o ramificada, o la combinación de las mismas, que puede estar completamente saturada, mono o poliinsaturada y puede incluir radicales di y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ significa de uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen, pero no se limitan a, 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 el que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturado incluyen, pero no se limitan a, 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. Son grupos alquilo preferentes los grupos alquilo C_{1-6} .

55 El término "alquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un alquilo, como se muestra a modo de ejemplo, pero sin limitación, mediante $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Por lo general, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, mostrándose a modo de ejemplo en la presente invención los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo inferior" o un "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono. Son grupos alquileo preferentes los grupos alquileo C_{1-6} .

60 El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique de otro modo, un radical hidrocarburo estable de cadena lineal o ramificada, o cíclico, o las combinaciones de los mismos, que consiste en al menos un átomo de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado entre el grupo que consiste en O, N, P, Si y S, y donde los átomos de nitrógeno y de azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El heteroátomo o heteroátomos O, N, P y S y Si pueden estar situados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH=CH-O-CH}_3$, -

Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, -CH=CH-N(CH₃)-CH₃, O-CH₃, -O-CH₂-CH₃, y -CN. Pueden ser consecutivos hasta dos heteroátomos, tales como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De forma análoga, el término "heteroalquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un heteroalquilo, como se muestra a modo de ejemplo, pero sin limitación, mediante -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera de los dos o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Aún más, para grupos de unión alquileo y heteroalquileo, la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de unión no implica ninguna orientación del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula -C(O)₂R' representa tanto -C(O)₂R' como -R'C(O)₂-. Tal como se ha descrito anteriormente, los grupos heteroalquilo, como se usan en el presente documento, incluyen los grupos que están unidos al resto de la molécula a través de un heteroátomo, tales como -C(O)R', -C(O)NR', -NR'R", -OR', -SR', y/o -SO₂R'. Cuando se indica un "heteroalquilo", seguido de las indicaciones de grupos heteroalquilo específicos, tal como -NR'R" o similar, se entenderá que los términos heteroalquilo y -NR'R" no son redundantes o mutuamente exclusivos. Por el contrario, los grupos heteroalquilo específicos se indican para añadir claridad. Por lo tanto, en el presente documento, el término "heteroalquilo" no se debería interpretar como excluyente de grupos heteroalquilo específicos, tales como -NR'R" o similares. Son grupos heteroalquilo preferentes los grupos heteroalquilo C₁₋₆.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroalquileo" se refiere a un grupo heteroalquilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos otros dos grupos. Los dos restos unidos al heteroalquileo pueden estar unidos al mismo átomo o a átomos diferentes del heteroalquileo. Son grupos heteroalquileo preferentes los grupos heteroalquileo C₁₋₆.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique de otro modo, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares. Un "cicloalquileo" y "heterocicloalquileo" se refiere a un radical divalente derivado de cicloalquilo y heterocicloalquilo, respectivamente. Los grupos cicloalquilo y heterocicloalquilo pueden ser grupos cicloalquilo C₃₋₈ y heterocicloalquilo C₃₋₈, o grupos cicloalquilo C₅₋₈ y heterocicloalquilo C₅₋₈.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, se refieren, a menos que se indique de otro modo, a un átomo de flúor, cloro, bromo, o yodo. Además, términos tales como "haloalquilo", pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo (C₁-C₄)" pretende incluir, pero no limitarse a, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares.

El término "arilo" significa, a menos que se indique de otro modo, un sustituyente hidrocarburo poliinsaturado, aromático, que puede ser un anillo individual o múltiples anillos (preferentemente de 1 a 3 anillos) que están condensados conjuntamente o unidos covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O, y S, donde los átomos de nitrógeno y de azufre están opcionalmente oxidados, y el átomo o átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternarizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un carbono o de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes 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-benzoimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables que se describen posteriormente. "Arieno" y "heteroarileno" se refiere a un radical divalente derivado de un arilo y heteroarilo, respectivamente. Los grupos arilo de la presente invención tienen preferentemente 5-12 miembros en el anillo, más preferentemente 6-10 miembros en el anillo. Los grupos heteroarilo de la presente invención tienen preferentemente 5-12 miembros en el anillo, más preferentemente 5-10 miembros en el anillo.

Para mayor brevedad, el término "arilo", cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquil) incluye anillos tanto de arilo como de heteroarilo como se han definido anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" pretende incluir los radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) ha sido reemplazado, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

El término "oxo", como se usa en el presente documento, significa un oxígeno que está unido por un doble enlace a un átomo de carbono.

El término "alquilsulfonilo", como se usa en el presente documento, significa un resto que tiene la fórmula $-S(O_2)-R'$, donde R' es un grupo alquilo como se ha definido anteriormente. R' puede tener un número específico de carbonos (por ejemplo, "alquilsulfonilo C_1-C_4 ").

- 5 Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretenden incluir formas tanto sustituidas como sin sustituir del radical indicado. Posteriormente se proporcionan sustituyentes a modo de ejemplo para cada tipo de radical.

10 Sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo los grupos que a menudo se denominan alquilenilo, alqueniilo, heteroalquilenilo, heteroalqueniilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueniilo, y heterocicloalqueniilo) pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados entre, pero no limitados a: $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR''R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$ en un número que varía de cero a $(2m' + 1)$, donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. Preferentemente, R' , R'' , R''' y R'''' se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir (por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos), alquilo sustituido o sin sustituir, grupos alcoxi o toialcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente del mismo modo que cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 4, 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, $-NR'R''$ pretende incluir, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior sobre los sustituyentes, los expertos en la materia entenderán que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de los grupos hidrógeno, tal como haloalquilo (por ejemplo, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (por ejemplo, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y similares).

25 De forma similar a los sustituyentes que se han descrito para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan entre, por ejemplo: halógeno, $-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR''R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, fluoroalcoxi (C_1-C_4), y fluoroalquilo (C_1-C_4), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromático; y donde preferentemente R' , R'' , R''' y R'''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R , se selecciona independientemente del mismo modo que cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos.

40 Dos sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden formar opcionalmente un anillo de fórmula $-T-C(O)-(CRR')-U-$, donde T y U son independientemente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. Alternativamente, dos sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados con un sustituyente de fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, donde A y B son independientemente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo formado de ese modo puede estar opcionalmente reemplazado con un doble enlace. Alternativamente, dos sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados con un sustituyente de fórmula $-(CRR')_s-X'(C''R''')_d-$, donde s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X' es $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$ o $-S(O)_2NR'-$. Preferentemente, los sustituyentes R , R' , R'' y R''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" o "heteroátomo en el anillo" pretende incluir oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P), y silicio (Si).

- 55 Un "grupo sustituyente", como se usa en el presente documento, significa un grupo seleccionado entre los siguientes restos:

(A) $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-CN$, $-CF_3$, $-NO_2$, oxo, halógeno, alquilo sin sustituir, heteroalquilo sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir, y

60 (B) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo, sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre:

(i) oxo, $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-CN$, $-CF_3$, $-NO_2$, halógeno, alquilo sin sustituir, heteroalquilo sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir, y

65

(ii) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo, sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre:

(a) oxo, -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, halógeno, alquilo sin sustituir, heteroalquilo sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir, y

(b) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre oxo, -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, halógeno, alquilo sin sustituir, heteroalquilo sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir, y heteroarilo sin sustituir.

Un "sustituyente de tamaño limitado" o un "grupo sustituyente de tamaño limitado", como se usa en el presente documento, significa un grupo seleccionado entre la totalidad de los sustituyentes que se han descrito anteriormente para un "grupo sustituyente", donde cada alquilo sustituido o sin sustituir es un alquilo C₁-C₂₀ sustituido o sin sustituir, cada heteroalquilo sustituido o sin sustituir es un heteroalquilo de 2 a 20 miembros sustituido o sin sustituir, cada cicloalquilo sustituido o sin sustituir es un cicloalquilo C₄-C₈ sustituido o sin sustituir, y cada heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir es un heterocicloalquilo de 4 a 8 miembros sustituido o sin sustituir.

Un "sustituyente inferior" o un "grupo sustituyente inferior", como se usa en el presente documento, significa un grupo seleccionado entre la totalidad de los sustituyentes que se han descrito anteriormente para un "grupo sustituyente", donde cada alquilo sustituido o sin sustituir es un alquilo C₁-C₈ sustituido o sin sustituir, cada heteroalquilo sustituido o sin sustituir es un heteroalquilo de 2 a 8 miembros sustituido o sin sustituir, cada cicloalquilo sustituido o sin sustituir es un cicloalquilo C₅-C₇ sustituido o sin sustituir, y cada heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir es un heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros sustituido o sin sustituir.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir compuestos que se preparan con ácidos y bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares que se encuentran en los compuestos que se describen en el presente documento. 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 tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, pura o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales de 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 tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, puro o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o fosforoso y similares, así como las sales que derivan de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos tales como los ácidos acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos tales como los ácidos glucurónico o galactunónico y similares (véase, por ejemplo, Berge *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 que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o de ácido.

Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden existir en forma de sales con ácidos farmacéuticamente aceptables. La presente invención incluye tales sales. Ejemplos de tales sales incluyen clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartratos (por ejemplo, (+)-tartratos, (-)-tartratos o las mezclas de los mismos incluyendo mezclas racémicas), succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico. Estas sales se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia.

Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferentemente poniendo en contacto la sal con un ácido o base y aislando el compuesto precursor de una forma convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas salinas en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares.

Además de las formas salinas, la presente invención proporciona compuestos están en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos que se describen en el presente documento son los compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. Además, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente invención mediante métodos químicos o bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un depósito de un parche transdérmico con una enzima o reactivo químico adecuado.

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas sin solvatar así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas sin solvatar y se

incluyen dentro del 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 que contempla la presente invención y se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención.

- 5 Determinados compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, tautómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos de la presente invención no incluyen los que se conocen en la técnica por ser demasiado inestables de sintetizar y/o aislar.
- 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 tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radiactivos, tales como, por ejemplo, tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, tanto si son radiactivas como si no, se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

15

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Las nuevas moléculas pequeñas sintéticas aumentan drásticamente la supervivencia de hESC después de la disociación en células individuales sin comprometer su autorrenovación a largo plazo y potencial de desarrollo total. **(a)** Estructuras químicas de Tiazovivina/Tzv y Pirintegrina/Ptn como se ha indicado. **(b)** Tinción con ALP de colonias de hESC que han crecido a partir de células individuales disociadas sembradas a baja densidad y tratadas como se indicado. **(c)** Relación de colonias ALP positiva frente a las células totales sembradas inicialmente. **(d)** Inmunotinción de las hESC mantenidas a largo plazo en medios que contienen Ptn o Tzv como se ha indicado. **(e)** Secciones de teratomas de 5 semanas formados a partir de hESC expandidas a largo plazo mantenidas en medios que contienen Tzv (i, ii) o Ptn (iii, iv). Neuroepitelio (ectodermo), cartílago (mesodermo), y epitelio simple (endodermo) (i); neuroepitelio (ectodermo), epitelio simple y epitelio de tipo hepático (endodermo) (ii); neuroepitelio (ectodermo), cartílago (mesodermo) y epitelio tubular (endodermo) (iii); neuroepitelio (ectodermo), músculo esquelético (mesodermo), y epitelio tubular (endodermo) (iv). **(f)** Análisis de coloración para bandas G de hESC después de más de 20 pasos, propagadas en presencia de los compuestos Ptn o Tzv. Si no se especifica, todas las hESC anteriores se hicieron crecer en medio químicamente definido y sin alimentadores sobre placas revestidas con Matrigel.

Figura 2. La Tzv estabiliza E-cadherinas después de la disociación celular para proteger las hESC de la muerte en el cultivo en suspensión. **(a)** Análisis de muerte celular de hESC disociadas que crecieron sobre Matrigel o en suspensión tratadas con o sin Ptn o Tzv. **(b)** Imágenes de contraste de fase de hESC que crecieron sobre placas revestidas tratadas con las moléculas indicadas. **(c)** Análisis por transferencia de Western de E-cadherinas en hESC que se transfectaron con los ARN_ic específicos frente a E-cadherina o GFP. **(d)** Análisis de muerte celular mediante tinción por TUNEL y **(e)** tinción con ALP de hESC disociadas que se transfectaron con los ARN_ic específicos frente a E-cadherina o GFP en presencia de Tzv. **(f)** Análisis por transferencia de Western de E-cadherinas de cadena completa en hESC antes y después de tripsina. **(g)** Análisis del curso del tiempo en transferencia de Western de la expresión de E-cadherinas de cadena completa después de disociación con tripsina y tratamiento con DMSO, Tzv, o Ptn para el tiempo indicado. **(h)** Análisis por citometría de flujo del nivel superficial de E-cadherina en hESC después de tratamiento con tripsina en presencia de Tzv. Se usó DMSO como control. **(i)** RT-PCR semicuantitativa de E-cadherina en hESC tratadas con o sin Tzv. **(j)** Análisis de endocitosis de E-cadherina en ausencia o presencia de Tzv. **(k)** Análisis de supervivencia celular de hESC que crecieron sobre placas revestidas con BSA o con diferentes concentraciones de E-cad-Fc quimérico.

Figura 3. Ptn y Tzv protegen las hESC de la muerte celular en cultivos adherentes después de disociación al mantener y reactivar la actividad de integrina. **(a)** Curva de crecimiento de hESC que crecieron sobre Matrigel con diferentes cursos de tiempo de tratamiento con Ptn y Tzv. Grupo 1, tratamiento con Ptn solamente durante las primeras 24 h; Grupo 2, tratamiento continuo con Ptn durante el periodo de cultivo completo; Grupo 3, tratamiento con Tzv solamente durante las primeras 24 h; Grupo 4, tratamiento continuo con Tzv durante el cultivo; para cada grupo de condiciones, se cultivaron en placa 10×10^4 células disociadas por pocillo de una placa de 6 pocillos. **(b)** Imágenes de contraste de fase de las hESC 12 horas después de sembrarse en las diferentes matrices y tratarse con los compuestos indicados. **(c)** Las hESC disociadas se sembraron en placa sobre placas revestidas con Matrigel y se permitió que se adhirieran durante 3 h en presencia de compuestos o junto con anticuerpo bloqueante de integrina $\beta 1$ como se ha indicado. El porcentaje de adhesión se calculó como se describe en la sección "Materiales y Métodos". **(d)** Análisis por transferencia de Western de integrina $\beta 1$ expresada por las hESC antes y después de tratamiento con tripsina. **(e)** Análisis del curso del tiempo en transferencia de Western de la expresión de integrina en las hESC después de disociación con tripsina y tratamiento con DMSO, Tzv, o Ptn para el tiempo indicado. **(f, g)** Análisis por citometría de flujo **(f)**, e inmunotinción **(g)** de las integrinas $\beta 1$ en la conformación activa de las hESC disociadas con tripsina después de tratamiento con Tzv o Ptn. **(h, i)** Adhesión celular **(h)** y tinción con ALP **(i)** de hESC tratadas con o sin el anticuerpo activante de $\beta 1$, TS2/16. **(j)** Adhesión celular de hESC tratadas con Tzv o Ptn en combinación con o sin un inhibidor de PKC. **(k)** Inmunotinción de integrinas $\beta 1$ en la conformación activa de hESC tratadas con o sin PMA (10 nM). **(l, m)** Adhesión celular **(l)** y tinción con ALP **(m)** de hESC tratadas con los compuestos indicados.

65

Figura 4. PI-3K y ERK mediados por receptores de factores de crecimiento son la principal señalización de supervivencia y antidiferenciación generada a partir del nicho de hESC, respectivamente. **(a)** Análisis de muerte celular de las hESC disociadas sembradas sobre Matrigel y tratadas como se ha indicado. **(b)** Transferencia de Western que muestra el estado de fosforilación de diferentes receptores del factor de crecimiento en las hESC tratadas con Ptn durante 2 h. Se usó DMSO como un control. **(c)** Análisis de muerte celular de las hESC disociadas en suspensión tratada con las condiciones indicadas. **(d)** Inmunoprecipitación que muestra la interacción de E-cadherinas con EGFR1 y Erb2. **(e)** Transferencia de Western que muestra el estado de fosforilación de AKT en las hESC tratadas con Ptn durante los períodos de tiempo indicados. **(f)** Transferencia de Western que muestra el estado de fosforilación de AKT y ERK en presencia de Ptn o junto con anticuerpo de bloqueo de integrina β 1. **(g)** Transferencia de Western que muestra el estado de fosforilación de AKT en las hESC tratadas con Ptn o junto con los inhibidores de receptores indicados. **(h)** Análisis de muerte celular de las hESC tratadas con Ptn o junto con inhibidor de PI-3 K, o inhibidor de MEK durante 24 h. **(i)** Porcentaje de células negativas para SSEA4 después del tratamiento con inhibidor de MEK.

Las **Figuras 5A y 5B** muestran compuestos de la presente invención, que incluyen tiazovivina y derivados de la misma.

Las **Figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 6I, 6J, 6K, 6L, 6M, 6N, 6O, 6P, 6Q, 6R, 6S, 6T, 6U, 6V, 6W, 6X, 6Y, 6Z, 6AA, 6AB y 6AC** muestran compuestos que incluyen pirintegrina y derivados de la misma.

Descripción detallada

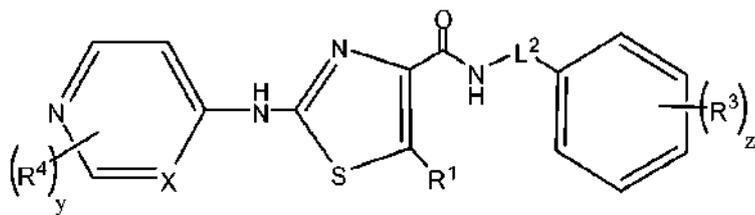
I. Introducción

La presente invención proporciona nuevos compuestos así como métodos para su uso. Se proporciona un tipo de compuestos químicos de molécula pequeña que evita la diferenciación de células y estimula la supervivencia celular, incluyendo, pero sin limitarse a, cuando las células se aíslan o se sacan de otro modo de su medio normal o entorno tisular. Los compuestos trabajan mediante mecanismos ligeramente diferentes pero ambos son útiles como compuestos profilácticos y terapéuticos para numerosas indicaciones diferentes de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, cáncer, el daño tisular, y apoplejía.

II. Compuestos que estimulan la supervivencia celular y/o la antidiferenciación

En un aspecto, se proporcionan compuestos que estimulan la supervivencia celular y/o antidiferenciación.

El compuesto que estimula la supervivencia celular y/o antidiferenciación tiene la fórmula:



En la Fórmula (II), y es un número entero de 0 a 3 y z es un número entero de 0 a 5. X es $-N=$, $-CH=$ o $-CR^5=$. R^1 es hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir; L^2 es alquileno C_1-C_6 sin sustituir.

R^3 es $-OR^{18}$, y R^{18} es hidrógeno o alquilo C_1-C_{10} sin sustituir. R^4 y R^5 son independientemente $-CN$, $-S(O)_nR^6$, $-NR^7R^8$, $-C(O)R^9$, $-NR^{10}-C(O)R^{11}$, $-NR^{12}-C(O)-OR^{13}$, $-C(O)NR^{14}R^{15}$, $-NR^{16}S(O)_2R^{17}$, $-OR^{18}$, $-S(O)_2NR^{19}$, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir, donde n es un número entero de 0 a 2.

R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} y R^{19} son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir.

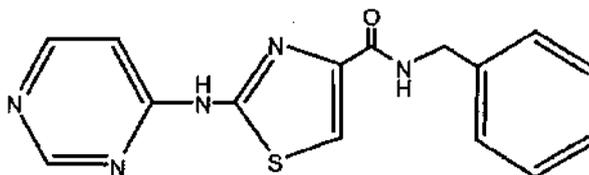
En algunas realizaciones, L^2 es metileno sin sustituir.

En otras realizaciones, X es -N= o -CH=. El símbolo z puede ser 2. El símbolo z también puede ser 1. El símbolo y puede ser 0 o 1.

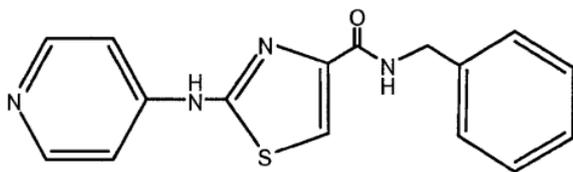
En algunas realizaciones, L² es metileno sin sustituir, X es -N= o -CH=, R¹ es hidrógeno, e y z son 0.

5

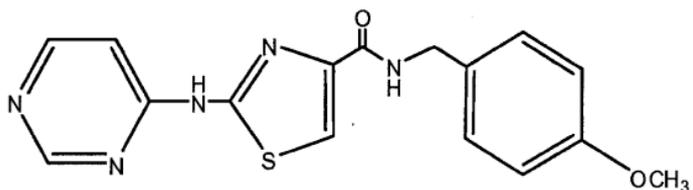
En otras realizaciones, el compuesto tiene la fórmula:



10 (denominado a veces Tiazovivina o "Tzv"),



o



15

En algunas realizaciones, cada grupo sustituido descrito anteriormente en los compuestos de Fórmula II está sustituido con al menos un grupo sustituyente. Más específicamente, en algunas realizaciones, cada alquilo sustituido, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo sustituido, arilo sustituido, heteroarilo sustituido, alquileno sustituido, y/o heteroalquileno sustituido descrito anteriormente en los compuestos de Fórmula II están sustituidos con al menos un grupo sustituyente. En otras realizaciones, al menos uno o la totalidad de estos grupos están sustituidos con al menos un grupo sustituyente de tamaño limitado. Alternativamente, al menos uno o la totalidad de estos grupos están sustituidos con al menos un grupo sustituyente inferior.

20

En otras realizaciones de los compuestos de Fórmula II, cada alquilo sustituido o sin sustituir es un alquilo C₁-C₂₀ sustituido o sin sustituir, cada heteroalquilo sustituido o sin sustituir es un heteroalquilo de 2 a 20 miembros sustituido o sin sustituir, cada cicloalquilo sustituido o sin sustituir es un cicloalquilo C₃-C₈ sustituido o sin sustituir, cada heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir es un heterocicloalquilo de 3 a 8 miembros sustituido o sin sustituir, cada alquileno sustituido o sin sustituir es un alquileno C₁-C₂₀ sustituido o sin sustituir, y/o cada heteroalquileno sustituido o sin sustituir es un heteroalquileno de 2 a 20 miembros sustituido o sin sustituir.

30

En algunas realizaciones, cada alquilo sustituido o sin sustituir es un alquilo C₁-C₈ sustituido o sin sustituir, cada heteroalquilo sustituido o sin sustituir es un heteroalquilo de 2 a 8 miembros sustituido o sin sustituir, cada cicloalquilo sustituido o sin sustituir es un cicloalquilo C₅-C₇ sustituido o sin sustituir, cada heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir es un heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros sustituido o sin sustituir, y/o cada alquileno sustituido o sin sustituir es un alquileno C₁-C₈ sustituido o sin sustituir, y/o cada heteroalquileno sustituido o sin sustituir es un heteroalquileno de 2 a 8 miembros sustituido o sin sustituir.

35

En algunas otras realizaciones, los compuestos de fórmula II pueden estar sustituidos con alquilo C₁₋₁₀, heteroalquilo C₁₋₁₀, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR''C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR'', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN, -NO₂, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, donde cada R', R'', R''' y R'''' son grupos hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, heteroalquilo C₁₋₁₀, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o arilalquilo.

40

45

III. Métodos de uso

Los compuestos de la presente invención son útiles para una gran diversidad de fines. Por ejemplo, los compuestos estimulan la supervivencia en situaciones (por ejemplo, para células aisladas) donde las células de otro modo irían a través de apoptosis o de otro modo morirían. En algunas realizaciones, las células se estabilizan durante al menos un periodo de tiempo en particular, por ejemplo, 10 minutos, 30 minutos, o 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, o 96 horas. Además, los compuestos son útiles en el mantenimiento del estado actual de diferenciación de células en condiciones donde las células de otro modo se diferenciarían o de otro modo cambiarían su programación. Estos efectos conducen a un gran número de usos para los compuestos *in vitro* o *in vivo*.

A. Usos *in vivo*

Los compuestos de la invención son útiles para reducir el daño tisular y por lo tanto se pueden administrar para tratar, mejorar, o prevenir el daño tisular. En algunas realizaciones, un compuesto de la invención se administra a un individuo que tiene, o que está en riesgo de tener daño tisular a un órgano interno. Los órganos internos incluyen, pero no se limitan a, cerebro, páncreas, hígado, intestino, pulmón, riñón, o corazón, formación de heridas, por ejemplo, por quemaduras o por corte. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los compuestos de la invención son eficaces para reducir el tamaño del infarto en la reperfusión después de isquemia. Por lo tanto, un compuesto de la invención se puede administrar a individuos en riesgo de padecer, que padecen, o que han padecido, una apoplejía. De forma análoga, un compuesto de la invención se puede administrar e individuos en riesgo de padecer, que padecen, o que han padecido, un ataque al corazón o daño cardíaco.

Los inventores han encontrado que los compuestos de la invención pueden prevenir la muerte celular, por ejemplo en células epiteliales. Por ejemplo, los inventores dispersaron células de islotes/beta primarias de páncreas humano sembradas como células individuales sobre una placa de cultivo tisular que se revistió con matrigel o con laminina. En medios regulares de cultivo celular para células beta sin Tzv se obtuvo como resultado una muerte celular básica. Sin embargo, cuando se añadió Tzv a los medios (1-2 mM), la muerte celular se inhibió. El mismo efecto se observó para otras células epiteliales primarias, tales como células neurales. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra a un individuo con necesidad de células pancreáticas beta y/o de islotes, donde la administración del compuesto da como resultado un aumento del número de las células beta o de islotes en el individuo.

Además, los compuestos de la invención (los que tienen la Fórmula II) son eficaces para aumentar el flujo sanguíneo y para inhibir respuestas inflamatorias. Por ejemplo, los compuestos de Fórmula II aumentan la adherencia y la migración de monocitos a través de monocapas de células endoteliales y de este modo pueden aliviar las respuestas inflamatorias (no se muestran los datos). Por lo tanto, en algunas realizaciones, un compuesto de la invención se administra a un individuo (por ejemplo, que padece isquemia cerebral) con necesidad de mayor flujo sanguíneo y/o inflamación reducida. Los que tienen necesidad de inflamación reducida incluyen individuos con enfermedad inflamatoria o con una enfermedad mediada por una afección inflamatoria. Las enfermedades inflamatorias a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteoartritis, tendinitis o bursitis, artritis gotosa, polimialgia reumática, fibromialgia, enfermedad inflamatoria pélvica y artritis, que incluye artritis reumatoide.

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención se usan para tratar o para mejorar el cáncer. En algunos casos, un compuesto de la presente invención se administra para tratar el cáncer, por ejemplo, carcinomas, gliomas, mesoteliomas, melanomas, linfomas, leucemias, adenocarcinomas, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de cuello del útero, glioblastoma, leucemia, linfoma, cáncer de próstata, y linfoma de Burkitt, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer hepatobiliar, cáncer de la vesícula biliar, cáncer del intestino delgado, cáncer rectal, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer de uretra, cáncer testicular, cáncer de cuello del útero, cáncer vaginal, cáncer, cáncer de ovarios, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer adrenal, cáncer endocrino pancreático, cáncer uterino carcinoide, cáncer óseo, cáncer de piel, retinoblastomas, linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin (véase, CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE (DeVita, V.T. *et al.* eds 1997) para cánceres adicionales).

La metástasis de células cancerosas por lo general es un proceso que implica la transición/EMT de epitelial a mesenquimal (por ejemplo, de células de tipo epitelial a células de tipo fibroblasto). Los inventores han encontrado que los compuestos de la invención (es decir, Tzv y Ptn) pueden inducir MET (la inversa de EMT) y pueden inhibir EMT, lo que indica que los compuestos son eficaces para reducir o para prevenir la metástasis del cáncer. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra a un individuo que padece o que está en riesgo de padecer metástasis del cáncer. Por ejemplo, los inventores han encontrado que los compuestos de fórmula II inhiben la metástasis de cánceres epiteliales que incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama y carcinoma hepatocelular.

En algunas realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra a un individuo que padece, o que está en riesgo de padecer, hipertensión y/o aterosclerosis.

Los compuestos de fórmula II (es decir, Tzv) son eficaces para estimular la regeneración axonal y la recuperación funcional en el sistema nervioso central lesionado. Por ejemplo, los inventores han encontrado que Tzv puede estimular la proliferación de neuritas a partir de células neuronales primarias de ratones. Tzv (3 μ M) se sometió a ensayo en explantes corticales P1 de ratón, con extensión de axones como resultado de la lectura. Se añadió Tzv al medio 20 minutos después de la siembra, con DMSO como un control. Los explantes se observaron durante 4 días en cultivo. Tzv mostró un efecto espectacular en la proliferación de axones, que fue notable a partir de 1 div. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra a un individuo que tiene una lesión en el sistema nervioso central o que tiene necesidad o que de otro modo se beneficiaría de la regeneración axonal.

En algunas realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra a un individuo que padece diabetes, resistencia a la insulina, o que de otro modo tiene necesidad de promoción de la supervivencia de células beta, o que está en riesgo de padecer una pérdida de la función de células beta.

Además, los compuestos de la invención encuentran uso en la mejora de síntomas negativos de, o de otro modo mejoran el trasplante de, órganos, células, o tejidos. Tal como se explica en el presente documento, los compuestos de la invención son eficaces para estabilizar y mantener la programación contextual de las células. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un compuesto de la invención se administra durante y después del trasplante de células, tejidos o un órgano a un individuo. Ejemplos de trasplantes incluyen, pero no se limitan a, trasplante de médula ósea, trasplante de cordón umbilical, células madre/precursoras hematopoyéticas purificadas, células cardíacas, células neurales, células beta pancreáticas, y células hepáticas.

B. Usos *in vitro*

Los compuestos de la presente invención son eficaces en la estabilización de células expuestas a una gran diversidad de condiciones. Muchas células animales, cuando se aíslan (en suspensión o como alternativa, cuando presentan adherencia) pierden viabilidad, van a través de apoptosis, y/o cambian la programación (por ejemplo, cuando se aíslan células madre, a menudo morirán o se diferenciarán). Los compuestos de la presente invención, cuando se mezclan con dichas células, son eficaces para prevenir dichas respuestas celulares a cambios ambientales. En algunas realizaciones, las células y aislar a partir de un animal y se ponen en contacto con un compuesto de la invención en una cantidad suficiente para prevenir pérdida de viabilidad celular y/o cambios en la programación celular. En algunas realizaciones, dichas células aisladas son útiles para el diagnóstico del mismo modo que las células aisladas mantienen fenotipos que de otro modo se perderían debido a la respuesta de las células al proceso de aislamiento y al aislamiento en sí mismo. Los fenotipos mantenidos a modo de ejemplo pueden incluir, por ejemplo, patrones de expresión genética, respuesta de las células a un estímulo, ligando, o fármaco, viabilidad celular.

La estabilidad de una población de células se puede controlar, por ejemplo, mediante el control de la expresión de los productos genéticos. Por ejemplo, determinados productos genéticos son específicos de tipo tisular o celular y se puede controlar antes y después de un cambio en las condiciones en torno (por ejemplo, cambio de medios celulares, descongelación de células, aislamiento de la célula a partir de otras células, etc.) para determinar si el cambio afecta a la programación celular. En algunas realizaciones, las células que se van a someter a un cambio de condición en torno, o relativamente poco después (por ejemplo, en un 1 minuto, 5 minutos, una hora, etc., dependiendo de las circunstancias) del cambio, se ponen en contacto con un compuesto de la invención en una cantidad suficiente de modo que uno o más marcadores de la expresión celular permanecen básicamente igual. "Básicamente igual" dependerá del contexto y se entenderá en la técnica. En algunas realizaciones, "básicamente igual" se refiere a que la expresión de un producto genético asociado a un tipo celular específico no cambia en más de un 10 %, un 20 % o un 30 % después de un tratamiento en particular a la célula (por ejemplo, en comparación con la expresión antes del tratamiento).

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para estimular la supervivencia y la antidiferenciación en células madre *ex vivo*. Por ejemplo, los inventores han encontrado que compuestos de Fórmula II (es decir, Tzv) son eficaces para estimular la supervivencia y la antidiferenciación en células madre de embriones humanos, células madre de embrión de ratón, células madre neurales, células madre de piel, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre del estroma y células madre epiteliales mediante la puesta en contacto de las células con un compuesto de Fórmula II inmediatamente después del aislamiento de las células.

Por consiguiente, la presente invención proporciona poblaciones de células y/o tejidos en contacto con una cantidad suficiente de un compuesto de la invención (un compuesto de Fórmula II) para estabilizar las células, por ejemplo, para prevenir o reducir respuestas celulares a cambios en las condiciones (por ejemplo, de aislamiento a partir de un tejido, descongelación de las células, etc.). En algunas realizaciones, por ejemplo, las células o tejidos en contacto con un compuesto de la invención están en un estado congelado o en un estado líquido. En algunas realizaciones, las células/tejidos se descongelan a partir de un estado congelado mientras están en contacto con una cantidad suficiente de un compuesto de la invención para prevenir o reducir el daño o la diferenciación celular.

En algunas realizaciones, un compuesto de la invención se pone en contacto con una población de células madre, células precursoras o células diferenciadas. Las células madre a modo de ejemplo incluyen células madre pluripotentes, células madre embrionarias, células madre inducidas (células iPS). Las células madre a modo de ejemplo también incluyen células madre de embrión humano, células madre de embrión de ratón, células madre neurales múltiples, células madre de piel, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre del estroma, y células madre epiteliales. Se puede usar cualquier tipo de células precursoras, incluyen, pero no se limitan a, células precursoras del endodermo, células precursoras del mesodermo (por ejemplo, células precursoras del músculo, células precursoras de hueso, de la sangre), y células precursoras del ectodermo (por ejemplo, células precursoras del tejido epidérmico y células precursoras neurales). Existe una gran diversidad de células diferenciadas conocidas. Las células diferenciadas incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, células cardíacas, células neurales, células beta pancreáticas, células hepáticas, células epiteliales, y células intestinales. Las células que se describen en el presente documento pueden ser células humanas o células no humanas. En algunas realizaciones, las células son células humanas. En algunas realizaciones, las células son células de ratón, perro, vaca, cerdo, rata o primate no humano.

La capacidad para mantener la viabilidad celular y la programación celular permite la mejora de métodos para identificación sistemática de fármacos y diagnóstico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula se identifica sistemáticamente para una respuesta en presencia de al menos un compuesto de la invención (un compuesto de fórmula II), manteniendo de ese modo la viabilidad de la célula, y además se pone en contacto con al menos uno de una pluralidad de agentes (por ejemplo, una biblioteca química) y a continuación se controla para una respuesta. Se conoce una amplia gama de métodos de identificación sistemática. Este método encuentra un beneficio en particular para uso con células que de otro modo podrían tener una viabilidad escasa en las condiciones del método de identificación sistemática (por ejemplo, cuando es conveniente usar células aisladas, células en suspensión, células adhesivas, etc.). Las células pueden ser, por ejemplo, células madre, células precursoras o células diferenciadas, tal como se describe en el presente documento. La respuesta celular puede ser cualquier respuesta deseada. Algunas respuestas en ensayos de identificación sistemática basados en células incluyen, pero no se limitan a, expresión de un gen (por ejemplo, en base a la expresión de un gen indicador o cuantificación por PCR u otra tecnología de detección), viabilidad celular o pérdida de la misma, inducción de apoptosis, etc.

Los agentes usados en los métodos de identificación sistemática pueden ser, por ejemplo, compuestos orgánicos pequeños (por ejemplo, con peso molecular inferior a 10.000 daltons, por ejemplo, inferior a 8000, 6000, 4000, 2000 daltons), lípidos, azúcares, polipéptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos, ADN, ARN, ribozimas, ARN inhibidor corto (ARNic), micro ARN (ARNmi), etc.).

En algunas realizaciones, los ensayos se diseñan para identificar sistemáticamente grandes bibliotecas combinatorias mediante la automatización de las etapas de ensayo y proporcionando compuestos a partir de cualquier fuente conveniente para los ensayos, que por lo general se realizan en paradero (por ejemplo, en formatos de microtitulación o en placas de micropocillos en ensayos automatizados). Las bibliotecas combinatorias pueden ser completamente aleatorias, o pueden comprender miembros que contienen una estructura núcleo basada en uno o más compuestos de dirección prometedores. Las videotecas combinatorias pueden ser completamente sintéticas o pueden incluir algunos o todos los miembros que se derivan a partir de fuentes de origen natural, que incluyen, por ejemplo, bacterias, hongos, plantas, insectos y vertebrados (por ejemplo, *Xenopus* (rana) o *Anguilla* (anguila)) y animales vertebrados (por ejemplo, *Strongylocentrotus* (véase erizo de mar) o moluscos). Además, véase, Boldi, Combinatorial Synthesis of Natural Product Based Libraries, 2006, CRC Press.

En una realización, los métodos de identificación sistemática de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca química o peptídica combinatoria que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos moduladores o ligandos potenciales). A continuación, dichas "bibliotecas químicas combinatorias" o "bibliotecas de ligandos" se identifican sistemáticamente en uno o más ensayos, tal como se describe en el presente documento, para identificar los miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas en particular) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de este modo pueden servir como "compuestos directores" convencionales o se pueden usar por sí mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica, mediante la combinación de un número de "componentes básicos" químicos tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma mediante la combinación de un conjunto de componentes básicos químicos (aminoácidos) en cada forma posible para un gran longitud de un compuesto dado (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de dicha mezcla combinatoria de componentes básicos químicos.

La preparación y la identificación sistemática de bibliotecas químicas combinatorias es bien conocida por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.663.046; N° 5.958.792; N° 6.185.506; N° 6.541.211; N° 6.721.665, cuyas divulgaciones se incorporan por la presente en el presente documento por referencia. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos

(véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos N° 5.010.175; Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37: 487-493 (1991); Houghton, *et al.*, *Nature* 354: 84-88 (1991); y Combinatorial Peptide Library Protocols, Cabilly, ed., 1997, Humana Press. Además, se pueden usar otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Dichas químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, Pat. de Estados Unidos N° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con formación de armazones de glucosa (Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661 (1994); Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential, Cortese, ed., 1995, Walter De Gruyter Inc; y Obrecht y Villalgordo, *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*, 1998, Elsevier Science Ltd), oligocarbamatos (Cho *et al.*, *Science* 261: 1303 (1993)), y/o peptidil fosfonatos (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59: 658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase Ausubel, *intra*, Sambrook y Russell, en el interior y Patentes de Estados Unidos N° 6.955.879; N° 6.841.347; N° 6.830.890; N° 6.828.098; N° 6.573.098; y N° 6.399.334), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.539.083; N° 5.864.010 y N° 6.756.199), bibliotecas de anticuerpos (véase, *por ejemplo*, Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14 (3): 309-314 (1996) y documentos PCT/US96/10287), bibliotecas de hidratos de carbono (véase, *por ejemplo*, Liang *et al.*, *Science*, 274: 1520-1522 (1996); Patente de Estados Unidos N° 5.593.853; y Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries, Seeberger, ed., 2004, John Wiley e Hijos (libro electrónico)), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C y EN, 18 de enero, ajena 33 (1993) y Patente de Estados Unidos N° 5.288.514; isoprenoides, Patente de Estados Unidos N° 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente de Estados Unidos N° 5.549.974; pirrolidinas, Patentes de Estados Unidos N° 5.525.735 y N° 5.519.134; compuestos de morfolino, Patente de Estados Unidos N° 5.506.337, y similares). Además, véase, *Combinatorial Library Design and Evaluation: Principles, Software Tools, and Applications in Drug Discovery*, Ghose, *et al.*, eds., 2001, Marcel Dekker; *Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry: Libraries and Drug Discovery*, Chaiken y Janda, eds., 1996, Oxford Univ Pr.; y *Combinatorial Library Methods and Protocols*, English, ed., 2002, Humana Press.

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, Advanced Chem Tech, Louisville KY., Symphony, Rainin, Woburn, MA., Applied Biosystems, Foster City, CA., Millipore, Bedford, MA y Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA).

En algunas realizaciones, los ensayos de identificación sistemática se pueden realizar convenientemente en placas de múltiples pocillos (por ejemplo, 96 pocillos, 384 pocillos, etc.) donde cada agente a identificar sistemáticamente se somete a ensayo individualmente en un solo pocillo. En algunas realizaciones, se someten a ensayo dos o más agentes candidatos en una sola mezcla de reacción.

C. Dianas alternativas para obtener efectos similares

Tal como se describe con detalle en los ejemplos que siguen a continuación, los inventores han aprendido sobre el papel de varios productos genéticos en la respuesta celular a los compuestos de la invención y esto ha llevado al descubrimiento de que las células también se pueden esterilizar por manipulación de los productos genéticos tal como se explica a continuación.

1. E-cadherina

Los inventores han encontrado que el aumento de la expresión de la E-cadherina mejora la supervivencia de las células madre. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para estabilizar y/o aumentar la expresión de la E-cadherina en una célula, estabilizando de ese modo la célula a partir de un cambio de condiciones que de otro modo sería perjudicial para la viabilidad de la célula. La estabilización de la E-cadherina puede incluir, POR ejemplo, poner en contacto las células con un compuesto que aumenta la expresión de la E-cadherina o en algún modo que proteja a la E-cadherina de la escisión proteolítica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos de cultivo de células madre (incluyendo pero no limitado a, células madre de embrión humano o de ratón) en un recipiente que tiene un con superficie revestida con una proteína que comprende al menos un ectodominio de la E-cadherina, opcionalmente unido a otro componente tal como una proteína de fusión, estabilizando de este modo las células (por ejemplo, manteniendo o aumentando la viabilidad de las células y/o manteniendo la programación celular). Un ectodominio es la parte de una proteína de membrana que se extiende en el espacio extracelular (el espacio fuera de una célula). En algunas realizaciones, los ectodominios son la parte de una proteína que inicia el contacto con la superficie que conduce a la transducción de señales. El ectodominio de la E-cadherina se describe, por ejemplo, en Ito *et al.*, *Oncogene* 18 (50): 7080-90 (1999). En algunas realizaciones, al menos, el ectodominio de la E-cadherina está condensado con una secuencia de polipéptidos de dimerización, permitiendo de este modo dímeros estabilizados del ectodominio. Un "polipéptido de dimerización" se refiere a una secuencia de aminoácidos que forma homodímeros, permitiendo de este modo que dos polipéptidos se dimericen. Los polipéptidos de dimerización a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un

fragmento Fc de IgG. En algunas realizaciones, las células madre (que incluyen, pero no se limitan a células madre de embrión humano o de ratón, células madre pluripotentes, células iPS) se disocian unas de otras y se cultivan en un recipiente que tiene una superficie revestida con una proteína que comprende al menos un ectodominio de la E-cadherina, opcionalmente unida a otro componente tal como una proteína de fusión, estabilizando de este modo a las células en la mejora de la tasa de supervivencia de las células en comparación con la tasa de supervivencia de células tratadas cultivadas en un recipiente que carece del revestimiento de polipéptido.

2. Proteína Quinasa C

La presente invención también proporciona la estabilización de las células mediante la puesta en contacto de las células con un activador de la proteína quinasa C. Tal como se explica en el presente documento, el tratamiento de las hESC disociadas con un activador de la proteína quinasa C desarrollado en presencia de una matriz de matrigel dio como resultado una adherencia celular y formación de colonias significativamente aumentadas, mejorando de ese modo la viabilidad celular. Por consiguiente, la invención proporciona el aumento de la viabilidad celular mediante el cultivo de células en presencia de un activador de la proteína quinasa C, mejorando de este modo la viabilidad, crecimiento, y/o adherencia celular. En algunas realizaciones, un activador de la proteína quinasa C se pone en contacto con poblaciones de células madre, células precursoras o células diferenciadas en una cantidad suficiente para mejorar la viabilidad y/o supervivencia y/o adherencia celular. Las células madre a modo de ejemplo incluyen células madre pluripotentes, células madre embrionarias, células madre inducidas (células iPS) o tal como se describe de otro modo en el presente documento. Los activadores de la proteína quinasa C a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ésteres de forbol (por ejemplo, 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) o ésteres de forbol tal como se describen en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 20080226589) o agonistas de péptidos (por ejemplo, tal como se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.165.977).

3. Integrina $\beta 1$

La presente invención también proporciona la estabilización de las células mediante la puesta en contacto de las células con un activador de la integrina $\beta 1$. Tal como se explica en el presente documento, el tratamiento de las hESC disociadas con un activador de la integrina $\beta 1$, donde las células se desarrollan sobre laminina dio como resultado una adherencia celular y una formación de colonias significativamente mejoradas, mejorando de ese modo la viabilidad celular. Por consiguiente, la invención proporciona la mejora de la viabilidad celular mediante el cultivo de células en presencia de un activador de la integrina $\beta 1$, mejorando de ese modo la viabilidad, crecimiento, y/o adherencia celular. En algunas realizaciones, un activador de la integrina $\beta 1$ se pone en contacto con poblaciones de células madre, células precursoras o células diferenciadas en una cantidad suficiente para mejorar la viabilidad y/o supervivencia y/o adherencia celular. Las células madre a modo de ejemplo incluyen células madre pluripotentes, células madre embrionarias, células madre inducidas (células iPS) o tal como se describe de otro modo en el presente documento. Los activadores de la integrina $\beta 1$ a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo de activación de la integrina $\beta 1$ tal como, por ejemplo, TS2/16 (disponible en el mercado, por ejemplo, en Thermo Scientific, Rockfield, III.).

IV. Poblaciones celulares

Tal como se analiza en el presente documento, la presente invención proporciona células en una mezcla (por ejemplo, un cultivo celular) con uno o más compuestos tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de fórmula I o III – que incluye, pero no se limita a Tzv y Pt – o un activador de la proteína quinasa C o un activador de la integrina $\beta 1$). En algunas realizaciones, descompuesto está en la mezcla en una concentración suficiente para mantener la viabilidad con la programación celular como respuesta a un cambio en el entorno o las condiciones celulares (por ejemplo, descongelación). Por ejemplo, en algunas realizaciones, los compuestos están en una concentración de al menos 0,1 nM, por ejemplo al menos 1, 10, 100, 1000, 10000, o 100000 nM, por ejemplo, entre 0,1 nM y 100000 nM, por ejemplo, entre 1 nM y 10000 nM, por ejemplo, entre 10 nM y 10000 nM, por ejemplo, entre 1-10 μ M. En algunas realizaciones, las mezclas están en un recipiente sintético (por ejemplo, un tubo de ensayo, una placa de Petri, etc.). Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células son células aisladas (no forman parte de un animal). En algunas realizaciones, las células son células adherentes o células en suspensión. En algunas realizaciones, las células se aíslan o se disocian a partir de una muestra de tejido (por ejemplo, una biopsia) de un animal (humano o no humano), se colocan en un recipiente, se ponen en contacto con uno o más compuestos tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I o III). Las células se pueden cultivar posteriormente y opcionalmente, insertar de nuevo en el mismo animal o en uno diferente, opcionalmente después de que las células se hayan estimulado para su diferenciación tipo o linaje celular en particular, o después de la introducción de un casete de expresión recombinantes en las células.

V. Cultivo de células

Las células se pueden cultivar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Las células se pueden cultivar en suspensión o como células adherentes si fuera apropiado.

En algunas realizaciones, las células (por ejemplo, células madre) se cultivan en contacto con células alimentadoras. Las células alimentadoras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a células de fibroblastos, por ejemplo, células de fibroblastos de embrión de ratón (MEF). En la técnica se conocen métodos para el cultivo de células alimentadoras.

5 En algunas realizaciones, las celdas se cultivan en ausencia de células alimentadoras. Las células, por ejemplo, se pueden unir directamente a una superficie sólida de cultivo (por ejemplo, una placa de cultivo), por ejemplo, a través de una sujeción molecular. Las sujeciones moleculares a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, matrigel, una matriz extracelular (ECM), análogos de ECM, laminina, fibronectina, o colágeno. Sin embargo, los expertos en la
10 materia reconocerán que esta lista no es limitante y que se pueden usar otras moléculas para unir células a una superficie sólida. En la técnica se conocen métodos para la unión inicial de las sujeciones a la superficie sólida.

VI. Formulaciones y Métodos de Administración

15 Las formulaciones (por ejemplo, que comprenden un compuesto de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a los adecuados para administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de
20 suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores, y conservantes. En la práctica de la presente invención, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral, por vía nasal, por vía tópica, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, o por vía intratecal. Las formulaciones de los compuestos se pueden presentar en envases cerrados herméticamente de una sola dosis o de dosis múltiples, tales como ampollas y viales. Las soluciones y las suspensiones se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos, y comprimidos del tipo que se ha descrito anteriormente. Además, los moduladores se pueden administrar como parte de un alimento o fármaco
25 preparado.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para inducir una respuesta beneficiosa al sujeto con el tiempo. El nivel de dosis óptima para cualquier paciente dependerá de una diversidad de factores que incluyen la eficacia del modulador específico usado, la edad, peso corporal, actividad
30 física, y dieta del paciente, sobre una combinación posible con otros fármacos, y de la gravedad de la enfermedad o afección en cuestión. Además, el tamaño de la dosis se determinará mediante la existencia, naturaleza, y extensión de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un compuesto o vector en particular en un sujeto en particular.

35 Para la determinación de la cantidad eficaz en principio activo administrar, un médico puede evaluar los niveles de plasma en circulación del compuesto o agente, toxicidad del compuesto o agente, y la producción de anticuerpos anti- compuesto o agente. En general, la dosis equivalente de un compuesto o agente es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto habitual.

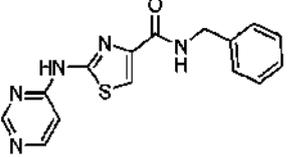
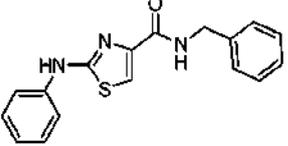
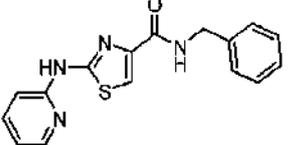
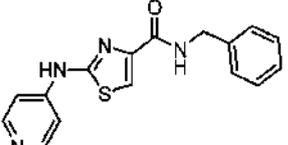
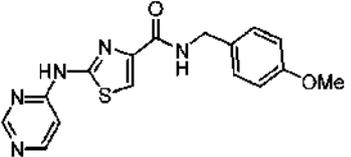
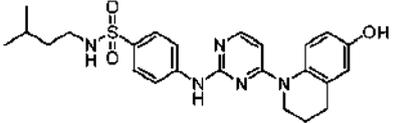
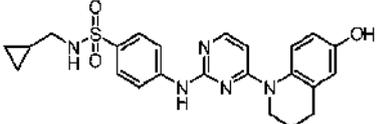
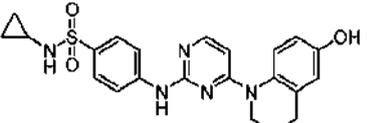
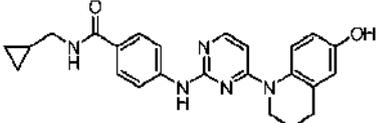
40 VII. Ejemplos

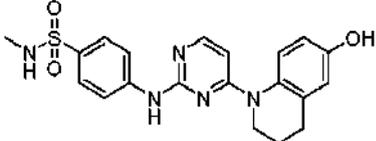
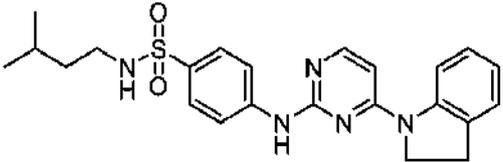
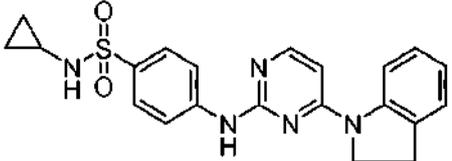
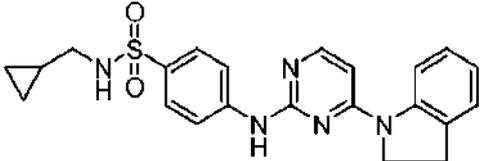
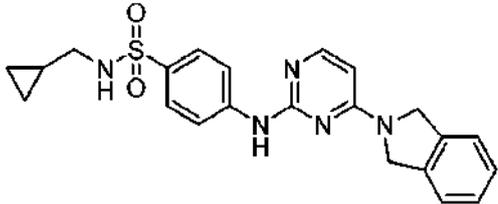
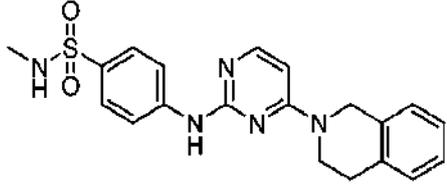
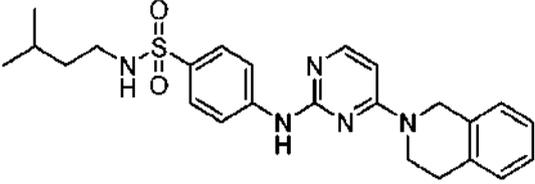
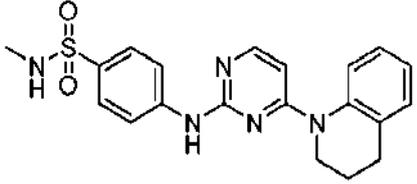
Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención que se reivindica.

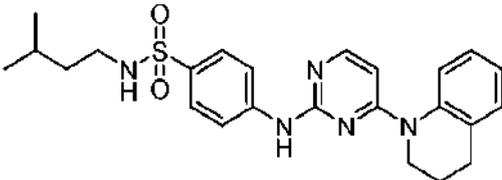
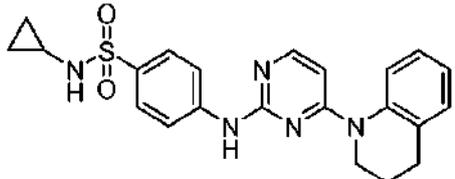
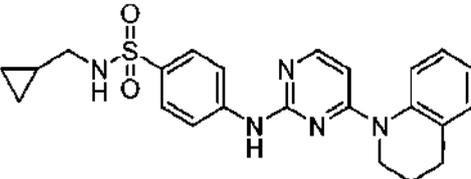
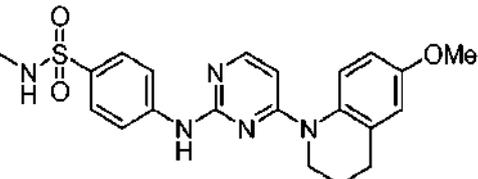
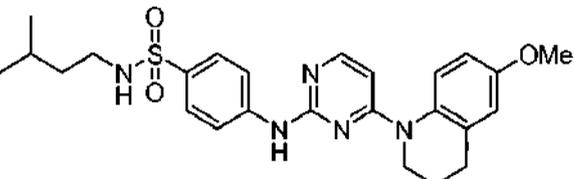
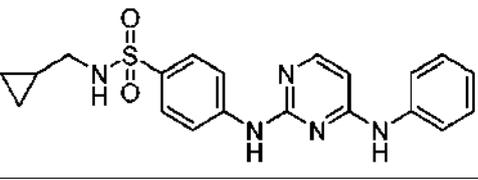
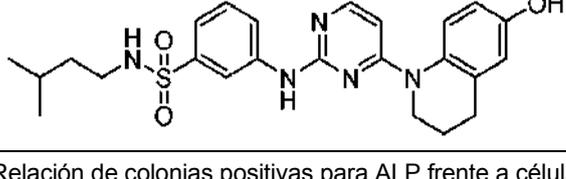
Ejemplo 1:

45 Para mejorar las condiciones del medio definido químicamente y descubrir el mecanismo molecular de la muerte de hESC después de una sola disociación celular, los inventores realizaron una selección se notifica de alto rendimiento de 50.000 compuestos sintéticos para la identificación sistemática moléculas pequeñas que estimulan la supervivencia de las hESC después de la disociación con tripsina. Para la identificación sistemática, se identificaron
50 dos clases químicas que aumentaban significativamente la supervivencia celular después de la disociación y además mantenían la morfología de las colonias de hESC y la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP). Las optimizaciones químicas y el análisis de actividad adicionales dio como resultado el descubrimiento de dos moléculas directoras, un tiazol disustituido en la posición 2,4 (denominado Tiazovivina/Tzv) y una pirimidina disustituida en la posición 2,4 (denominada Pirintegina/Ptn) (Fig.1a), para caracterizaciones funcionales y
55 mecanísticas adicionales.

Tabla 1. Datos de actividad

Compuesto	Actividad (% de formación de colonias positivas para ALP mediante las hESC) ¹
	24,1
	4,5
	5,2
	20,3
	5
	23,5
	23,2
	8
	2,9

Compuesto	Actividad (% de formación de colonias positivas para ALP mediante las hESC) ¹
	5,7
	3,1
	6,2
	6,1
	3,5
	3,6
	3,2
	3

Compuesto	Actividad (% de formación de colonias positivas para ALP mediante las hESC) ¹
	3,4
	3,1
	5,2
	3,1
	3,3
	3,3
	3,1

¹ Relación de colonias positivas para ALP frente a células totales sembradas inicialmente.

5 El compuesto Tzv o Ptn potencia la supervivencia de las hESC individuales en más de 20 veces sobre placas revestidas con Matrigel después de la disociación enzimática (Fig. 1b, c). Las hESC se habían pasado en serie en medio definido químicamente que contiene Tzv o Ptn durante más de 20 generaciones. En dichas condiciones, las células mantenían de forma homogénea de la morfología característica de las hESC, la expresión de los marcadores de pluripotencia habituales, y el cariotipo normal (Fig. 1d, e). Cuando estas células inyectaron en ratones desnudos, estos generaron teratomas complejos que consistían en todos los tres tejidos de la capa germinal primaria (Fig. 1f). Estos resultados, confirmados con varias líneas de hESC independientes, de forma colectiva y convincente

demonstraron que ambos compuestos podrían estimular básicamente la supervivencia de hESC sin comprometer la autorrenovación y toda la potencia de desarrollo.

Se sabe que las hESC son difíciles de formar en cuerpos embrioides (EBs) en cultivo en suspensión después de la disociación celular individual debido a la extensión de la muerte celular. Por lo tanto, los inventores también han sometido a ensayo si Tzv o Ptn podrían estimular la supervivencia de las hESC disociadas en suspensión. De forma interesante, Tzv mejoró la supervivencia de las hESC en gran medida tanto en cultivos adherentes como de suspensión. Por el contrario, Ptn solamente estimuló la supervivencia de las hESC en cultivo adherente (por ejemplo, sobre placa revestida con Matrigel), pero no tuvo efecto alguno en el cultivo en suspensión (Fig. 2a). Estas observaciones sugieren que están implicados al menos dos mecanismos distintos en estos dos tipos de muerte celular en condiciones de ECM/Matrigel o suspensión, y que Tzv y Ptn funcionan de forma diferente. Las hESC forman buenos agregados celulares cuando se desarrollan en suspensión y en presencia de Tzv (Fig. 2b), y se podrían diferenciar en diversos linajes (no se muestran los datos). Dado que la agregación celular está mediada de forma más frecuente a través de adhesiones célula-célula y que la E-cadherina es la molécula principal de adhesión célula-célula, así como que se expresa en forma muy elevada en las hESC (Eastham, A.M. *et al.*, Cancer Res 67 (23): 11254-11262 (2007)), los investigadores sometieron a ensayo el efecto de un anticuerpo específico que bloquea la E-cadherina en la formación de agregados multicelulares. Cuando las células se cultivaron en presencia del anticuerpo, la supervivencia celular y la formación de agregados compactos y grandes inducidos por el tratamiento con Tzv se inhibió drásticamente, lo que indica que la supervivencia y el ensamblaje celular de agregados multicelulares inducidos por Tzv implican a la E-cadherina funcional (Fig. 2b). Además, la anulación de la E-cadherina mediante los ARN_i específicos en las hESC redujeron drásticamente la supervivencia celular inducida por el tratamiento con Tzv, y disminuyó de forma significativa el número de colonias positivas para ALP (Fig. 2c, d, e). Estos resultados sugieren que Tzv aumenta la supervivencia de las hESC en suspensión, actuando presuntamente a través de la adhesión célula-célula mediada por E-cadherina.

A continuación los inventores examinaron la expresión de la E-cadherina en las hESC después de la disociación con tripsina. Los inventores encontraron que la mayor parte de toda la longitud de la E-cadherina se había extinguido después de la disociación con tripsina (Fig. 2f). Esta observación era coherente con el informe de que la región extracelular de la E-cadherina tiene un sitio de escisión endoproteolítico cercano al dominio de transmembrana (Damsky, C.H. *et al.*, Cell 34 (2): 455-466 (1983)). En células sin tratar con Tzv, la E-cadherina de longitud total recién sintetizada aparecía 1 h después del tratamiento enzimático y desaparecía después de 4 h, lo que sugiere que las E-cadherinas recién sintetizadas en las hESC disociadas no eran estables. Sin embargo, en células tratadas con Tzv, la expresión de la E-cadherina aumentó de forma significativa (Fig. 2g). Además, el análisis de citometría de flujo reveló que las E-cadherinas de la superficie celular en las hESC aumentaron de forma significativa por Tzv (Fig. 2h). Por lo tanto, es probable que Tzv afecte a la adhesión celular mediante la modulación del nivel de la superficie celular de las E-cadherinas. La RT-PCR semicuantitativa reveló cantidades comparables de transcritos de E-cadherina en controles simulados y células tratadas con Tzv (Fig. 2i), lo que sugieren que la diferencia en los niveles de proteínas de E-cadherina no se debían a los niveles alterados de transcripción. Es probable que Tzv ejerza su efecto a través de la estabilización de la E-cadherina sobre la superficie celular. Por último, el ensayo de endocitosis reveló que la internalización de E-cadherinas se bloqueaba de forma significativa con Tzv. Estos resultados indican que Tzv regula las actividades de E-cadherina a través de la inhibición de la endocitosis de E-cadherinas (Fig. 2j).

La disociación celular-célula con tripsina conduce a una escisión rápida y a la posterior desestabilización de E-cadherinas. Los investigadores tienen la hipótesis de que la estabilidad de la E-cadherina también se podría mediar con interacción homofílica entre las células. Por lo tanto, la unión homofílica de E-cadherinas con ligandos recombinantes puede estabilizar las E-cadherinas y afectar a la supervivencia de hESC. Para someter a ensayo esta hipótesis, los investigadores revistieron placas con una proteína quimera de E-cadherina-Fc dimérica que contiene el ectodominio de E-cadherina condensado con el fragmento Fc de IgG (Ecad-Fc). De forma sorprendente, las hESC disociadas unidas a la superficie revestida y su tasa de supervivencia estaba aumentada de forma significativa de una manera dependiente de la dosis (Fig. 2k), lo que confirma que la adhesión célula-célula mediada por that E-cadherina es un regulador importante para la supervivencia de hESC.

Tanto Tzv como Ptn tienen un efecto espectacular en la supervivencia de las hESC desarrolladas sobre placas revestidas con Matrigel. Dicho efecto de estimulación de la supervivencia parece improbable debido a la influencia sobre el crecimiento celular y se puede atribuir en gran medida al aumento de la capacidad de adhesión celular que sigue a la disociación celular y a procesos de siembra (Fig. 3a, b). De hecho, las hESC disociadas que se trataron con Tzv o Ptn presentaron una adhesión a Matrigel o laminina aumentada de forma espectacular. Por el contrario, la adhesión de las hESC a gelatina o poli-lisina (Fig. 3b y los datos no se muestran), que no implica a integrinas, no se vio afectada por el tratamiento con Ptn o Tzv. El componente principal del Matrigel es la laminina, y se informó que el receptor de laminina β 1 integrina se expresa de forma elevada en las hESC (Xu, C. *et al.*, Nat Biotechnol 19 (10): 971-974 (2001)). Para someter a ensayo si Ptn o Tzv actúa a través de la integrina β 1, los inventores trataron previamente las celdas con un anticuerpo del bloqueo frente a la integrina β 1, y se observó que la mayor unión celular inducida por el tratamiento con el compuestos se eliminó totalmente. Esto sugiere que Tzv y Ptn mediante la adhesión celular a sustratos de ECM a través de la integrina β 1 (Fig. 3c).

Para adentrarse en el mecanismo de la regulación de la integrina $\beta 1$ por Tzv y Ptn, los investigadores investigaron si el efecto de los compuestos se debe a cambios en la expresión de la integrina. En contraste con la E-cadherina, la integrina $\beta 1$ no se escindía con tripsina. El análisis de transferencia de Western reveló que el efecto de los compuestos se debía con poca probabilidad al aumento de las expresiones de la integrina $\beta 1$. Por lo tanto, es probable que Tzv y Ptn afecten a la adhesión celular mediante la modulación de la actividad de la integrina (Fig. 3d, e). Para examinar los efectos del tratamiento con el compuesto sobre la actividad de la integrina $\beta 1$, los inventores usaron el anticuerpo monoclonal HUTS-21, que se une específicamente a la forma activada de la integrina $\beta 1$ (Luque, A. *et al.*, *J Biol Chem* 271 (19): 11067-11075 (1996)). En particular, el tratamiento con compuestos aumentó el nivel de unión de HUTS-21 (Fig. 3f, g). Estos resultados sugieren en conjunto que Tzv y Ptn aumentan la adhesión celular mediante la modulación de dentro a fuera de la actividad de la integrina.

Si ambos compuestos químicos potencian la adhesión celular mediante la conversión de integrinas en una conformación activa, el tratamiento de las células con el anticuerpo que activa la integrina, que bloquea integrinas en una conformación activa, deberían tener un efecto similar tal como los compuestos. De hecho, cuando las hESC disociadas se sembraron sobre laminina en presencia de TS2/16, un anticuerpo de activación a la integrina $\beta 1$ (van de Wiel - van Kemenade, E. *et al.*, *J Cell Biol* 117 (2): 461-470 (1992)), adhesión celular se vio aumentada de forma significativa y las células formaron un mayor número de colonias en comparación con el control (Fig. 3h, i). Estos resultados sugieren que la mayor adhesión, que se produce cuando las células se tratan con estos compuestos, implica un mecanismo que induce la activación de la integrina.

Además, para analizar minuciosamente el maniqueísmo celular mediante el cual Tzv y Ptn regulan la actividad de la integrina, los investigadores examinaron los efectos de varios inhibidores de la ruta. Los investigadores encontraron que la bisindolilmaleimida I, un inhibidor específico de PKC, podría antagonizar la mayor adhesión celular inducida por Ptn, pero no tuvo efecto sobre la adhesión celular inducida por Tzv. Esto sugiere que PKC puede mediar la acción de Ptn pero no la de Tzv (Fig. 3j). Además, para confirmar el papel de PKC sobre la supervivencia de hESC, las hESC disociadas se trataron con en el agonista de PKC, 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA). El tratamiento de PMA provocó la activación de la integrina, así como un aumento básico en la adhesión celular y en la formación de colonias (Fig. 3k, l, m).

El destino de las células madre se ve influenciado por su nicho celular, que consiste en factores de crecimiento, interacción célula-ECM, e interacción célula-célula. El hecho de que la supervivencia de hESC es altamente dependiente de la interacción célula-célula y/o la interacción célula-ECM, reveló la importancia de dicho nicho *in vitro* sin reconocer anteriormente para hESC. De forma más importante, las expresiones de proteínas intrínsecas celulares (por ejemplo, E-cadherinas e integrinas) y mecanismos de regulación (por ejemplo, estabilización y activación de proteínas), no solamente responden a, sino que también son componentes de nicho básicos, lo que sugiere que las células madre poseen una capacidad intrínseca para construir su propio nicho en ausencia de otros factores extrínsecos o tipos celulares, que sin embargo pueden participar y aumentar el mecanismo de nicho autorregulador de las células.

La interacción entre el entorno físico/estructural y el factor de crecimiento desempeña un papel muy importante en la regulación del destino celular (Comoglio, P.M., Boccaccio, C, y Trusolino, L, *Curr Opin Cell Biol* 15 (5): 565-571 (2003)). Para examinar si los factores de crecimiento se ven implicados en la supervivencia de hESC mediada por integrina, los inventores trataron las hESC disociadas con Tzv o Ptn junto con inhibidores del receptor del factor de crecimiento altamente específicos. Los investigadores descubrieron que la inhibición química de FGFR, IGFR, EGFR1 o Erb2 disminuyó en gran medida el efecto de estimulación de la supervivencia inducido por el tratamiento con Tzv o Ptn (Fig. 4a). Además, Ptn aumentó de forma significativa la fosforilación del receptor del factor de crecimiento, lo que sugiere que la participación de receptores del factor de crecimiento es necesaria para la supervivencia celular mediada por integrina (Fig. 4b). De forma análoga, la inhibición de FGFR, IGFR, EGFR1 o Erb2 también eliminó en gran medida la supervivencia de hESC inducida por Tzv en cultivo en suspensión. Además, Tzv indujo la unión de E-cadherinas a EGFR1 y ERB2, lo que indica el papel importante de los receptores del factor de crecimiento en la supervivencia celular mediada por la E-cadherina (Fig. 4c, d).

La señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3K) y MAPK/ERK son reguladores principales para la autorrenovación de hESC (Armstrong, L *et al.* *Hum Mol Genet* 15 (11): 1894-1913 (2006); Paling, N.R. *et al.*, *J Biol Chem* 279 (46): 48063-48070 (2004); Pyle, A.D., Lock, L.F., y Donovan, P.J., *Nat Biotechnol* 24 (3): 344-350 (2006); Li, J. *et al.*, *Differentiation* 75 (4): 299-307 (2007)). La fosforilación de ERK y AKT, un efecto corriente abajo de PI-3K, se vio aumentada después del tratamiento de las hESC disociadas con Ptn, y este aumento se eliminó mediante anticuerpo de bloqueo de la integrina (Fig. 4e, f). Además, la activación de AKT y ERK por Ptn se bloqueó mediante inhibidores de FGFR, IGFR, EGFR o Erb2 (Fig. 4g y los datos no se muestran). La inhibición química de la acción de PI-3K antagonizó de forma significativa el efecto de supervivencia inducido por Ptn (Fig. 4h). La inhibición de ERK no tuvo un efecto espectacular sobre la supervivencia inducida por Ptn pero indujo la diferenciación de hESC (Fig. 4i). Estos resultados demostraron que la actividad de PI-3K es una señalización de la supervivencia principal y la activación de ERK es una señalización de antiferenciación generada por el nicho a través de la activación de receptores del factor de crecimiento.

En resumen, los inventores identificaron dos moléculas pequeñas sintéticas nuevas con distintos mecanismos de acción a partir de una identificación sistemática fenotípica de alto rendimiento que aumenta principalmente la supervivencia de hESC después de una sola disociación celular. Dichas herramientas químicas y herramientas biológicas recién identificadas a través de caracterizaciones mecanísticas (por ejemplo, Ecad-Fc recombinante
5 definido para la unión de hESC en cultivos adherentes; anticuerpos de activación para mayor supervivencia y unión celular) permitirían un cultivo de hESC más robusto y facilitarían de forma significativa aplicaciones de las hESC tales como dirección genética o descubrimiento de fármacos. De forma más importante, caracterizaciones mecanísticas en profundidad sin descubrir, previamente no reconocían mecanismos de nicho que son necesarios para mantener la supervivencia y la proliferación de hESC. Dicho nicho consiste en interacción mediada por E-cadherina entre hESC entre sí mismas, interacción células-ECM mediada por integrina, y factores de crecimiento.
10 Estudios anteriores han indicado un papel importante de factores de crecimiento sobre la autorrenovación de hESC. Sin embargo, la activación completa de la señalización del factor de crecimiento requiere no solamente la presencia de factores de crecimiento y receptores sino también una interacción con un microentorno en particular. Cuando este entorno físico/estructural se destruye, los factores de crecimiento solos no son suficientes para la autorrenovación de las ESC.
15

Recientemente, se informó de que los fibroblastos diferenciados generados a partir de las hESC en cultivo de autorrenovación creaban nicho *in vitro* para las hESC (Bendall, S.C. *et al.*, Nature 448 (7157): 1015-1021 (2007)). Bajo condiciones del medio definidas químicamente por nuestra parte y otras ajenas, en escasas ocasiones los
20 inventores observan dichas células diferenciadas en cultivo a largo plazo, lo que sugiere que dicho nicho artificial se podría crear debido a las diferencias de los medios. Sin embargo, los estudios de los inventores revelan mecanismos de nicho únicos de células autónomas (es decir, interacción célula-célula) y células no autónomas (es decir, célula-ECM y -factor de crecimiento) para la supervivencia y la autorrenovación de hESC, que probablemente pueden desempeñar papeles importantes en el control del destino de las células madre adultas *in vivo*.
25

La disociación célula-célula con tripsina conduce no solamente a la desestabilización de las E-cadherinas sino también a la inactivación de las interinas, lo que indica que la señalización que mantiene la actividad de integrina es sensible al tratamiento enzimático. Los medios alimentadores condicionados por células (con suero rico en factor de crecimiento) no proporcionaron demasiada protección frente a la muerte celular después de la disociación celular individual. Además, el hecho de que la siembra de células hasta densidad también induce un aumento en la adhesión/supervivencia celular sugiere que la señalización necesaria para mantener la actividad de integrina podría no proceder de factores segregados sino en su lugar de interacciones físicas célula-célula. Tzv inhibe la endocitosis E-cadherina, y por lo tanto protege a las células de la muerte en suspensión. De forma análoga, mediante la inhibición de la endocitosis, Tzv puede mantener la actividad de integrina mediante la estabilización de la
30 señalización desde la superficie celular. Por otro lado, Ptn puede imitar la señalización corriente abajo a partir de una interacción física célula-célula para activar PKC. La futura identificación diana de Ptn puede arrojar nueva luz sobre el mecanismo mediante el cual la adhesión célula-célula regula la interacción célula-ECM. Nuestra investigación también puso a modo de ejemplo la viabilidad y el avance de la identificación sistemática química de alto rendimiento en estudios de células madre. El desarrollo y la aplicación adicional de dicho enfoque químico en células madre
35 conducirá sin duda alguna a la identificación de nuevas moléculas pequeñas adicionales y a una visión mecanística para el control del destino celular de forma precisa *in vitro* e *in vivo*.
40

Métodos

45 Cultivo celular

Las líneas H1, HUES7 y HUES9 de ESC humano se cultivaron sobre células alimentadoras de MEF irradiadas en DMEM-F12 complementado con L-glutamina 2 mM, 1x de aminoácidos no esenciales, reemplazo con suero al 20 % (Invitrogen) y 10 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos (Invitrogen). El cultivo de hESC sin
50 alimentador y definido químicamente se ha descrito anteriormente (Yao, S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (18): 6907-6912 (2006)). En resumen, las hESC se cultivaron sobre placas de cultivo tisular revestidas con Matrigel en N2B27-CDM (DMEM-F12 complementado con 1x de suplementos N2, 1x de suplementos B27, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,11 mM, 1x de aminoácidos no esenciales, y 0,5 mg/ml de BSA (fracción V)) y 20 ng/ml de bFGF. Las ESC humanas se pasaron cada 5-6 días con tripsina al 0,05 %.
55

Para ensayos de supervivencia clonal, las hESC individuales se diluyeron hasta una densidad clonal y se sembraron sobre placas de 96 pocillos revestidas con Matrigel. Para ensayos de supervivencia de baja densidad, se sembraron 500 células sobre placas de 96 pocillos revestidas con Matrigel. Para visualizar las colonias de hESC, los cultivos se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 5 min, se lavó una vez en PBS, a continuación se hizo tinción
60 para la actividad de fosfatasa alcalina tal como se describe en las instrucciones del fabricante. El recuento de las colonias positivas para ALP se hizo sobre un microscopio invertido.

Reactivos

65 El kit de detección de ALP y los anticuerpos de integrina eran de Chemicon. AG825 (inhibidor de Erb2), AG1478 (inhibidor de EGFR), PPP (inhibidor de IGFR1) y se adquirieron en Calbiochem. Los anticuerpos producidos frente a

la cola intracitoplasmática de las E-cadherinas (Transduction Laboratories, Lexington, KY) se usaron para la inmunoprecipitación. El anticuerpo TS2/16 era de Pierce. Los anticuerpos frente al dominio extracelular de la molécula de E-cadherina eran de Zymed (Carlsbad). Los anticuerpos frente a quinasa/MAPK regulada por señal extracelular, EGFR1, ERB2, GADPH y forma fosforilada de AKT eran de Cell Signaling. La antifosfotirosina monoclonal de ratón (clon 4G-10) era de Upstate Biotechnology. Se añadieron Ptn y Tzv al medio de cultivo a 2 μ M.

Identificación sistemática química de alto rendimiento.

Las líneas HUES7 o HUES9 de hESC tripsinables se usaron para identificación sistemática. Las hESC se cultivaron en medios definidos químicamente sobre la placa revestida con Matrigel tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, las células se cosecharon con tripsina. Las hESC se sembraron a 4.000 células por pocillos sobre placas de 384 pocillos revestidas con Matrigel. Después de 1 h, cuando las células sedimentaron, los compuestos a partir de una biblioteca de 50.000 heterociclos separados se añadieron a cada pocillo (concentración final de 2 μ M). Después de un período adicional de 6 días de incubación, donde los medios y los compuestos se cambiaron en el día 3, se hizo tinción de las células para la expresión de ALP y se examinó para la morfología de colonias compactas.

Análisis de inmunotinción.

La inmunotinción se realizó tal como se ha descrito anteriormente (Yao, S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (18): 6907-6912 (2006)). En resumen, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente (TA) durante 15 min. A continuación, las células se incubaron a TA en tampón de bloqueo durante 1 hora. La incubación de anticuerpos primarios se realizó durante una noche a 4 °C. Se usaron los siguientes anticuerpos disponibles en el mercado a una concentración de 1:100 en tampón del bloqueo: anti SSEA4, anti Oct4 (Chemicon??) anti Nang (Chemicon). La tinción se visualizó usando anticuerpos secundarios conjugados con FITC, cy3 o cy5 (Jackson ImmunoResearch).

Formación de teratomas y cariotipo.

Los experimentos de formación de teratomas se realizará mediante la inyección de 3-5 millones de células hESC (mantenidas en presencia de los compuestos Tzv o Ptn) en la cápsula renal de ratones desnudos. Después de 4-5 semanas, todos los ratones desarrollaron teratomas, que se retiraron y la continuación se analizaron de forma inmunohistológica en el Scripps Research Institute Research Histology Service and Animal Resources. Se formó el cariotipo de las células tratadas con compuestos mediante coloración convencional para bandas G en el Children's Hospital Oakland, Cytogenetics Laboratory. No se encontró ninguna anomalía cromosómica en los 10 núcleos elegidos al azar.

Ensayo por TUNEL

Las hESC bajo diferentes tratamientos se disociaron con tripsina y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Y la tinción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MBL Laboratories, Watertown, MA). Después de la tinción, las muestras se analizaron por citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD).

Análisis por citometría de flujo

Para evaluar la expresión de E-cadherina, integrina activada y SSEA4, células disociadas (3×10^5) se lavaron con PBS y se volvieron a suspender en PBS que contenía suero de cabra al 2 %. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo apropiado durante 1 h a 4 °C, se lavó con la solución de bloqueo, y se marcó con anticuerpo secundario conjugado con FITC durante 30 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur.

Ensayo de adhesión celular

Los ensayos de adhesión celular se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos revestidas con Matrigel. Después de tripsina, las hESC se volvieron a suspender en los medios definidos químicamente que contenían los compuestos deseados. A continuación, las células añadieron a las placas de microtitulación y se incubaron durante 3 h a 37 °C. Las células no unidas y las unidas débilmente se retiraron mediante agitación y lavado, y a continuación las células restantes se fijaron inmediatamente. Los pocillos se lavaron 3 veces con 200 μ l de H₂O, y las células unidas se tiñeron con Violeta Cristal (Sigma). A continuación, se midió la absorbancia de cada pocillo a 570 nm. Para experimentos con anticuerpos del bloqueo, las células se incubaron previamente con anticuerpos sobre hielo durante 30 min, y los ensayos de adhesión se realizaron en presencia de anticuerpos. Cada muestra se sometió ensayo tres veces independientemente.

Ensayo de endocitosis

Las hESC se incubaron con 1,5 mg/ml de etil-ditiopropionato de sulfosuccinimidil 2-(biotinamido) (sulfo-NHS-SS-biotina) (Pierce Chemical Co.) sobre hielo, seguido de lavado e inactivación. La endocitosis de la E-cadherina se inició mediante la supresión de Ca^{2+} e incubación a 37 °C. A continuación, las células se incubaron en dos lavados de 20 minutos con solución de glutatión (glutatión 60 mM, NaCl 0,83 M, con NaOH 0,83 M y BSA al 1 % añadidos antes de su uso) a 0 °C que retiró todos los grupos biotina de la superficie celular. Las proteínas biotiniladas restantes se atraparon dentro de las células por endocitosis y por lo tanto se protegieron de la eliminación con glutatión. Las proteínas biotiniladas se recuperaron sobre perlas de estreptavidina y se analizaron por SDS-PAGE. Las E-cadherinas se detectaron por inmunotransferencia. El nivel total de la E-cadherina en la superficie antes de la endocitosis se usó como referencia.

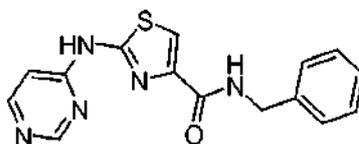
Ejemplo 2: Síntesis de *N*-bencil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida (Tiazovivina)**15 Síntesis Química**

Usando los ejemplos de síntesis química que se presentan a continuación y dos métodos de síntesis química conocidos generalmente en la técnica, un experto en la materia es capaz de preparar los compuestos que se divulgan en el presente documento (por ejemplo, los compuestos de Fórmula II).

Todos los compuestos químicos obtenidos en el mercado se usaron sin purificación adicional. Los espectros de RMN se registraron en un instrumento Bruker (400 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se midieron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se indican en Hz. LCMS se realizó con un sistema para LCMS de cromatografía líquida en fase inversa-espectrómetro de masas Agilent 1100 con fuente de ionización API-ES. La cromatografía líquida a alta presión se realizó con columna C18 con un gradiente lineal de disolvente A al 10 % (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,035 %) en disolvente B (agua con ácido trifluoroacético al 0,05 %) a A al 90 % en siete minutos y medio, seguido de dos minutos y medio de elución con A al 90 %.

Síntesis de *N*-bencil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida (Tiazovivina)

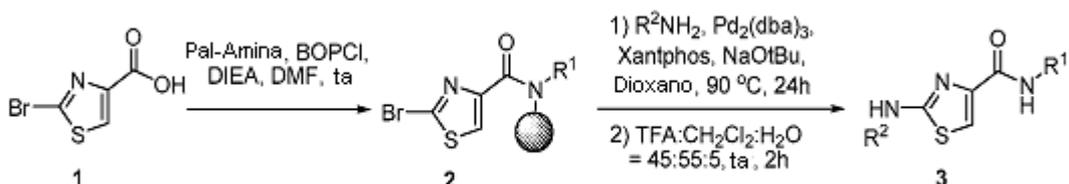
Se cargó bencil amina a resina de poliestireno funcionalizada con 4-formil-3,5-dimetoxifenoximetilo (PAL) a través de aminación reductora para dar la resina de PAL-bencilamina. Véase, Ding, S.; Grey, N. S. Wu, X.; Ding, Q.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 1594-1596. Un matraz de reacción que contenía resina de PAL-bencilamina (200 mg, 0,2 mmol), ácido 2-bromo-tiazol-4-carboxílico (83 mg, 0,4 mmol), cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BOP-Cl) (153 mg, 0,6 mmol) y diisopropiletilamina (0,17 ml, 1 mmol) en DMF (3 ml) se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La resina se lavó con metanol, diclorometano y se secó al vacío para dar resina de PAL-*N*-bencil-2-bromotiazol-4-carboxamida, que a continuación se añadió a un vial de reacción secado a la llama, seguido de 4-aminopirimidina (95 mg, 1 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (46 mg, 0,05 mmol), Xantphos (87 mg, 0,15 mmol) y NaO^tBu (192 mg, 2 mmol). El vial se cerró con tapón de seguridad y se desgasificó, y a continuación se cargó con argón y dioxano anhidro (1,5 ml). La reacción se agitó durante 24 horas a 90 °C. La resina se lavó con solución de dietilditiocarbamato sódico (0,05 M en DMF), metanol y diclorometano y se secó al vacío. La resina se escindió posteriormente con cóctel de escisión TFA: CH_2Cl_2 : H_2O (45:55:5) (2 ml) durante 2 h. La resina se filtró, el filtrado se recogió y se evaporó al vacío para dar el compuesto en bruto que a continuación se purificó por HPLC para dar el compuesto del título (30 mg, 48 %).

***N*-Bencil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida**

50 Masa exacta calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{OS}$: 311,1, encontrado LCMS $m/z = 334,1$ ($\text{M}+\text{Na}^+$).

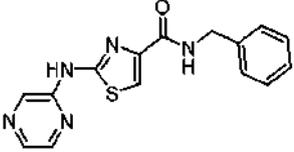
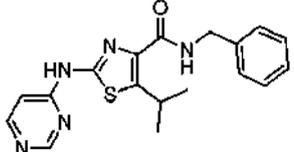
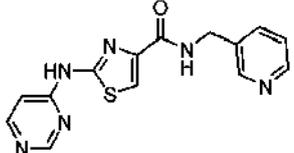
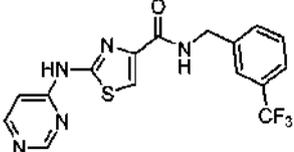
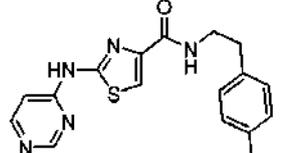
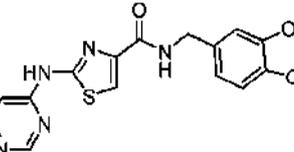
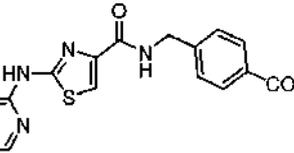
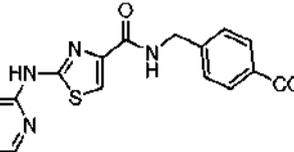
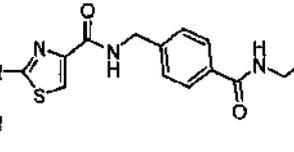
RMN ^1H (400 MHz, d_6 -DMSO) 4,49 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 5,76 (s, 1H), 7,21-7,27 (m, 2H), 7,30-7,34 (m, 4H), 7,85 (s, 1H), 8,45 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H), 8,51 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H), 8,94 (s, 1H).

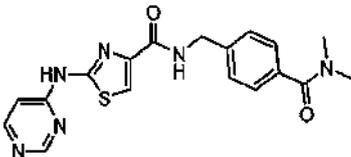
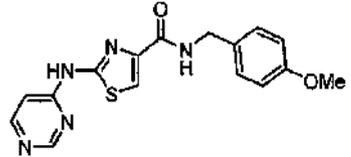
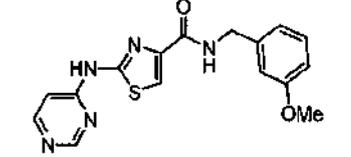
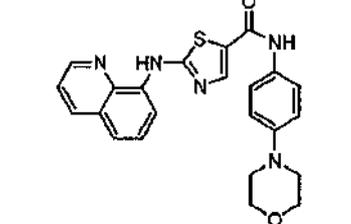
55

Ejemplo 3: Síntesis de Derivados deTiazovivina

- 5 Las aminas R^1NH_2 apropiadas se cargaron previamente a resina de poliestireno (PAL) funcionalizado con 4-formil-3,5-dimetoxifenoximetilo a través de aminación reductora para dar resina de PAL-bencilamina. Una mezcla de resina de PAL-bencilamina (200 mg, 0,2 mmol, 1,0 equiv.), ácido 2-bromotiazol carboxílico 1 (0,4 mmol, 2,0 equiv.), cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BOP-Cl) (0,6 mmol, 3,0 equiv.) y diisopropiletilamina (1 mmol, 5,0 equiv.) en DMF anhidra (3 ml) se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La resina se lavó con metanol, diclorometano y se secó al vacío, que a continuación se añadió a un mundial de reacción secado a la llama, seguido de la R^2NH_2
- 10 correspondiente (1 mmol, 5,0 equiv.), $Pd_2(dba)_3$ (0,05 mmol), Xantphos (0,15 mmol) y $NaOtBu$ (2 mmol, 10,0 equiv.). El vial se cerró con tapón de seguridad y se desgasificó, y a continuación se cargó con argón y dioxano anhidro (1,5 ml). La reacción se agitó durante 24 horas a 90 °C. La resina se lavó con solución de dietilditiocarbamato sódico (0,05 M en DMF), metanol y diclorometano y se secó al vacío. La resina se escindió posteriormente con cóctel de escisión: TFA:CH₂Cl₂:H₂O = 45:55:5 (2 ml) durante 2 h. La resina se filtró y el filtrado se recogió y se evaporó al vacío para dar el compuesto en bruto que a continuación se purificó por HPLC para dar el compuesto **3** del título deseado.
- 15

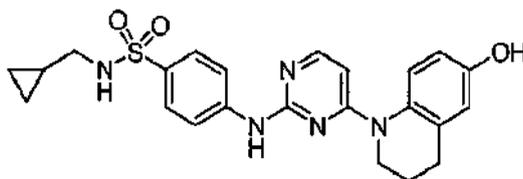
Estructura	Nombre	Datos
	N-bencil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS Tr = 1,49 min, [MH ⁺] 312, [MNa ⁺] 334.
	N-bencil-2-(6-metoxipirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS Tr = 2,12 min, [MH ⁺] 342.
	N-bencil-2-(fenilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS Tr = 2,45 min, [MH ⁺] 310.
	N-bencil-2-(piridin-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS Tr = 1,69 min, [MH ⁺] 311.
	N-bencil-2-(piridin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS Tr = 1,57 min, [MH ⁺] 311.

Estructura	Nombre	Datos
	N-bencil-2-(pirazin-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS Tr = 2,02 min, [MH ⁺] 312.
	N-bencil-5-isopropil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS Tr = 1,90 min, [MH ⁺] 354.
	N-(piridin-3-ilmetil)-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS [MH ⁺] 312.
	2-(pirimidin-4-ilamino)-N-(3-(trifluorometil)bencil)tiazol-4-carboxamida	LC/MS [M ⁺] 379.
	N-(4-metoxifenetil)-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS [M ⁺] 355.
	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS [MH ⁺] 356.
	4-((2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamido)metil)benzoato de metilo	LC/MS [MH ⁺] 370.
	ácido 4-((2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamido)metil)benzoico	LC/MS [MH ⁺] 356.
	N-(4-(butilcarbamoil)bencil)-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS [MH ⁺] 411.

Estructura	Nombre	Datos
	N-(4-(dimetilcarbamoil)bencil)-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS [MH ⁺] 383.
	N-(4-metoxibencil)-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS [MH ⁺] 342.
	N-(3-metoxibencil)-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS [MH ⁺] 342.
	N-(4-morfolinofenil)-2-(quinolin-8-ilamino)tiazol-5-carboxamida	LC/MS [MH ⁺] 432.

Ejemplo de Referencia 4: Síntesis de N-(ciclopropilmetil)-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)bencenosulfonamida (Pirintegrina)

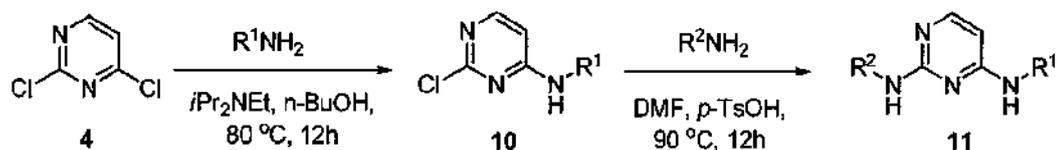
- 5 El matraz de reacción que contenía 2,4-dicloropirimidina (372 mg, 2,5 mmol), 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (489 mg, 3 mmol) y diisopropiletilamina (0,52 ml, 3 mmol) en n-butanol (10 ml) se calentó a 40 °C durante una noche. El disolvente se evaporó, y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 2-Cloro-4-(6-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidina (551 mg, 80 %). Este compuesto intermedio (250 mg, 0,91 mmol) se disolvió a continuación en diclorometano y se trató con BBr₃ (1 M en diclorometano) (1 ml, 1 mmol) a -78 °C. La mezcla de reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 h, se vertió en agua, se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 2-Cloro-4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidina (154 mg, 65 %). A una solución agitada de 2-cloro-4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidina (29 mg, 0,11 mmol) y 4-amino-N-(ciclopropilmetil)bencenosulfonamida (27 mg, 0,12 mmol) en DMF (0,5 ml) se añadió ácido p-toluenosulfónico (2 M en dioxano) (55 µl, 0,11 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante una noche, a continuación se purificó por HPLC para dar el compuesto del título (27 mg, 56 %).



20 **N-(Ciclopropilmetil)-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)bencenosulfonamida**

Masa exacta calculada para C₂₃H₂₅N₅O₃S: 451,2, encontrado LCMS m/z = 452,3 (M+H⁺).

- 25 RMN ¹H (400 MHz, d₆-DMSO) 0,05-0,09 (m, 2H), 0,32-0,36 (m, 2H), 0,75-0,81 (m, 1H), 1,90-1,95 (m, 2H), 2,64 (t, J = 6,4 Hz, 4H), 3,93 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 6,59 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 6,66-6,70 (m, 2H), 7,25-7,28 (m, 1H), 7,64 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 7,74 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,82 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 8,01 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 10,79 (s, 1H).

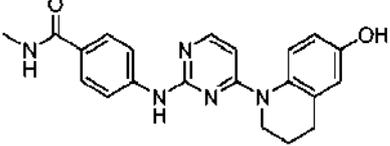
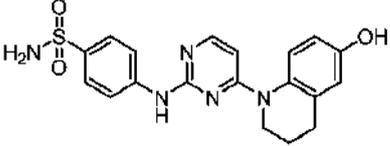
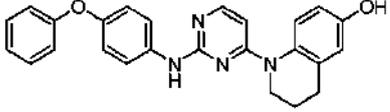
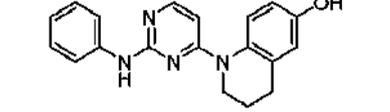
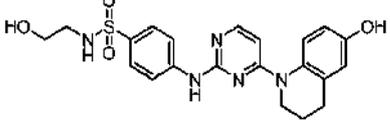
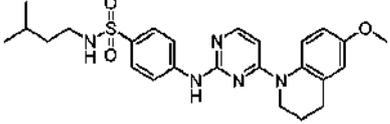
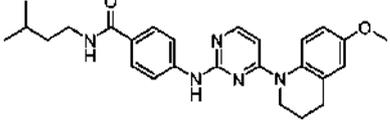
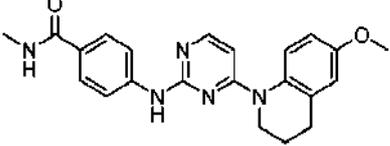
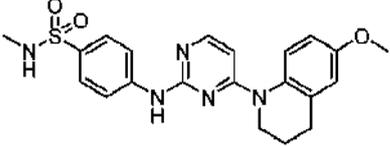
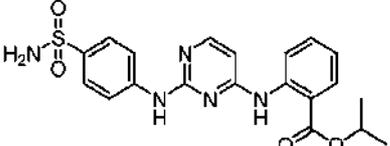
Ejemplo de Referencia 5: Síntesis de Derivados de Pirintegrina

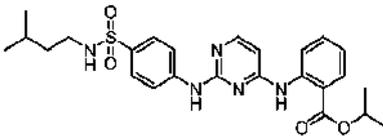
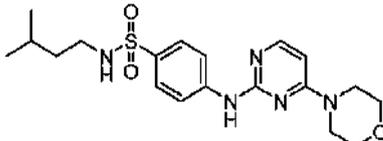
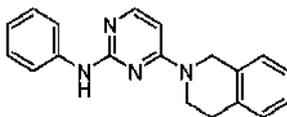
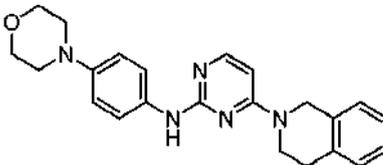
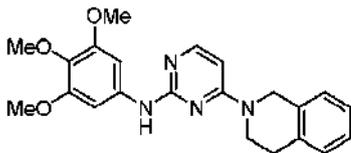
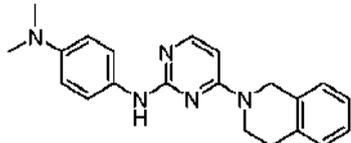
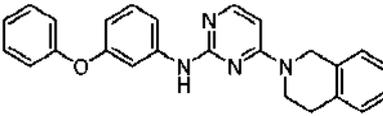
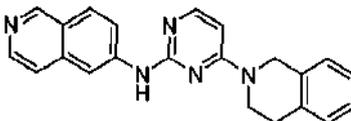
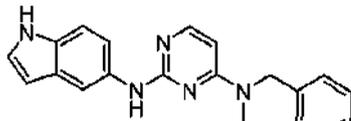
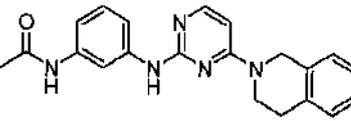
5

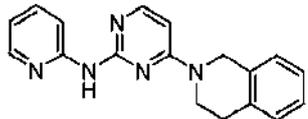
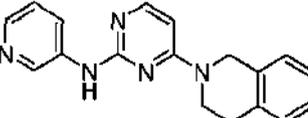
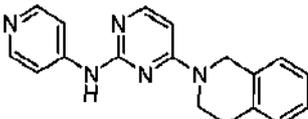
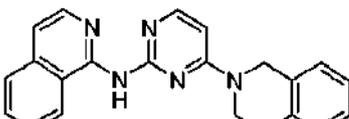
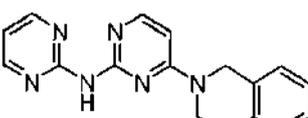
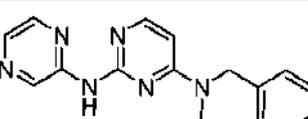
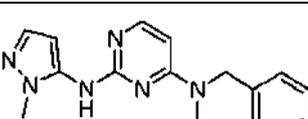
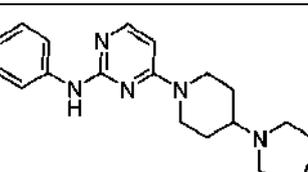
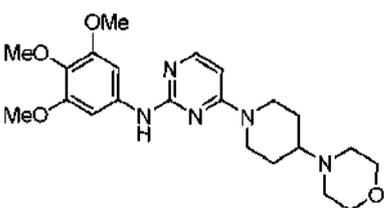
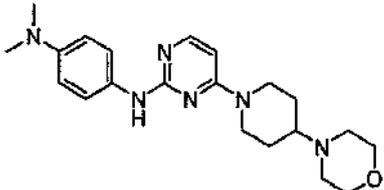
A una mezcla de 2,4-dicloropirimidina **4** (1,0 equiv.), R^1NH_2 (1,2 equiv.) y diisopropiletilamina (1,2 equiv.) en n-butanol se calentó a 80 °C durante una noche. El disolvente se evaporó, y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida hasta el compuesto intermedio **10** con un rendimiento excelente (> 80 %), que a continuación se trató con R^2NH_2 (1,2 equiv.) en DMF y se añadió ácido p-toluenosulfónico (2 M en dioxano) (1,2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante una noche, y a continuación se purificó directamente por HPLC preparativa para dar derivados de Pirintegrina **11** con rendimientos excelentes.

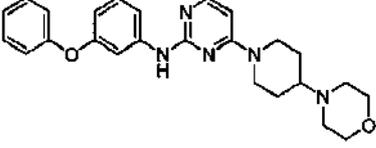
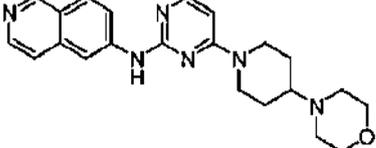
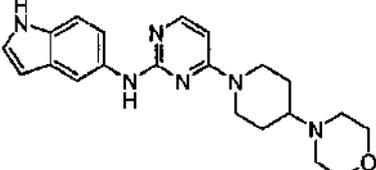
10

Estructura	Nombre	Datos
	N-(ciclopropilmetil)-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)benzenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 452.
	N-(ciclopropilmetil)-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)benzamida	LC/MS [MH ⁺] 416.
	N-ciclopropil-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)benzenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 438.
	N-ciclopropil-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)benzamida	LC/MS [MH ⁺] 402.
	4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)-N-isobutilbenzenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 468.
	4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)-N-metilbenzenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 412.
	4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)-N-isopentilbenzamida	LC/MS [MH ⁺] 432.

Estructura	Nombre	Datos
	4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)-N-metilbenzamida	LC/MS [MH ⁺] 376.
	4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)bencenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 398.
	1-(2-(4-fenoxifenilamino)pirimidin-4-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ol	LC/MS [MH ⁺] 411.
	1-(2-(fenilamino)pirimidin-4-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-ol	LC/MS [MH ⁺] 319.
	4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)-N-(2-hidroxi-etil)bencenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 442.
	N-isopentil-4-(4-(6-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)bencenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 482.
	N-isopentil-4-(4-(6-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)benzamida	LC/MS [MH ⁺] 446.
	4-(4-(6-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)-N-metilbenzamida	LC/MS [MH ⁺] 390.
	4-(4-(6-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)-N-metilbencenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 423.
	2-(2-(4-sulfamoilfenilamino)pirimidin-4-ilamino)benzoato de isopropilo	LC/MS [MH ⁺] 428.

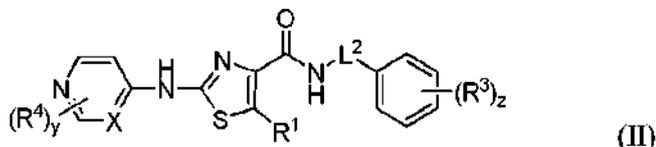
Estructura	Nombre	Datos
	2-(2-(4-(N-isopentilsulfamoyl)fenilamino)pirimidin-4-ilamino)benzoato de isopropilo	LC/MS [MH ⁺] 498.
	N-isopentil-4-(4-morfolinopirimidin-2-ilamino)benzenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 406.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-fenilpirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 2.03 min, [MH ⁺] 303.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(4-morfolinofenil)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.84 min, [MH ⁺] 388.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.95 min, [MH ⁺] 393.
	N1-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-il)-N4,N4-dimetilbenceno-1,4-diamina	LC/MS Tr = 1.49 min, [MH ⁺] 346.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(3-fenoxifenil)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 2.36 min, [MH ⁺] 395.
	N-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-il)isoquinolin-6-amina	LC/MS Tr = 1.51 min, [MH ⁺] 354.
	N-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-il)-1H-indol-5-amina	LC/MS Tr = 1.96 min, [MH ⁺] 342.
	N-(3-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-ilamino)fenil)acetamida	LC/MS Tr = 1.80 min, [MH ⁺] 360.

Estructura	Nombre	Datos
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(piridin-2-il)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.95 min, [MH ⁺] 304.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(piridin-3-il)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.42 min, [MH ⁺] 304.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(piridin-4-il)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.40 min, [MH ⁺] 304.
	N-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-il)isoquinolin-1-amina	LC/MS Tr = 2.20 min, [MH ⁺] 354.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1 H)-il)-N-(pirimidin-2-il)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.70 min, [MH ⁺] 305.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(pirazin-2-il)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.56 min, [MH ⁺] 305.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.64 min, [MH ⁺] 307.
	4-(4-morfolinopiperidin-1-il)-N-fenilpirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 0.97 min, [MH ⁺] 340.
	4-(4-morfolinopiperidin-1-il)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)pirimidin-2-amina	LC/MS Tr = 1.11 min, [MH ⁺] 430.
	N1,N1-dimetil-N4-(4-(4-morfolinopiperidin-1-il)pirimidin-2-il)benceno-1,4-diamina	LC/MS [MH ⁺] 383

Estructura	Nombre	Datos
	4-(4-morfolinopiperidin-1-il)-N-(3-fenoxifenil)pirimidin-2-amina	LC/MS [MH ⁺] 379
	N-(4-(4-morfolinopiperidin-1-il)pirimidin-2-il)isoquinolin-6-amina	LC/MS [MH ⁺] 391
	N-(4-(4-morfolinopiperidin-1-il)pirimidin-2-il)-1H-indol-5-amina	LC/MS [MH ⁺] 379

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



5

donde,

L² es alquileo C₁-C₆ sin sustituir; e

y es un número entero de 0 a 3;

z es un número entero de 0 a 5;

X es -N=, -CH= o -CR⁵=;

R¹ es hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

R³ es -OR¹⁸, y R¹⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀ sin sustituir;

R⁴ y R⁵ son independientemente -CN, -S(O)_nR⁶, -NR⁷R⁸, -C(O)R⁹, -NR¹⁰-C(O)R¹¹, -NR¹²-C(O)-OR¹³, -C(O)NR¹⁴R¹⁵, -NR¹⁶S(O)₂R¹⁷, -OR¹⁸, -S(O)₂NR¹⁹, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir, donde n es un número entero de 0 a 2; y

R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷ y R¹⁹ son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

o un racemato, diastereómero, tautómero, o un isómero geométrico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde L² es metileno.

3. El compuesto de la reivindicación 1, donde X es -N= o -CH=.

4. El compuesto de la reivindicación 1, donde R¹ es hidrógeno.

5. El compuesto de la reivindicación 1, donde

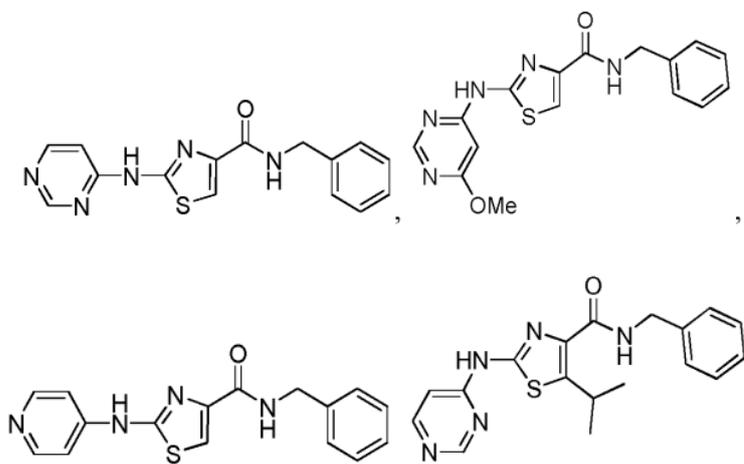
L² es metileno;

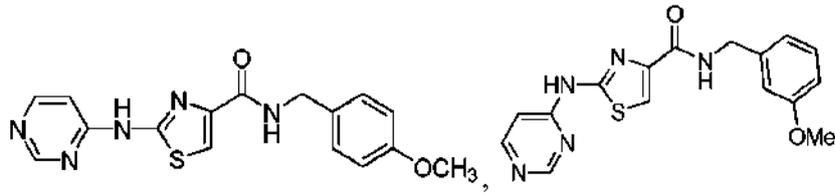
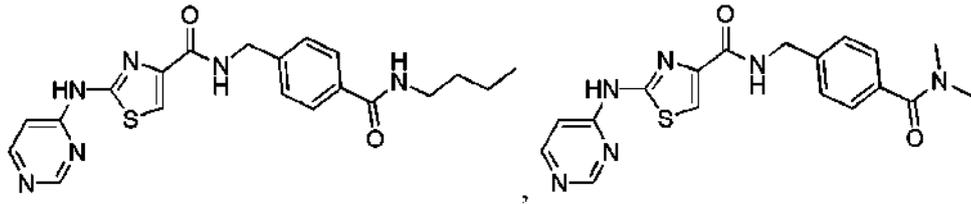
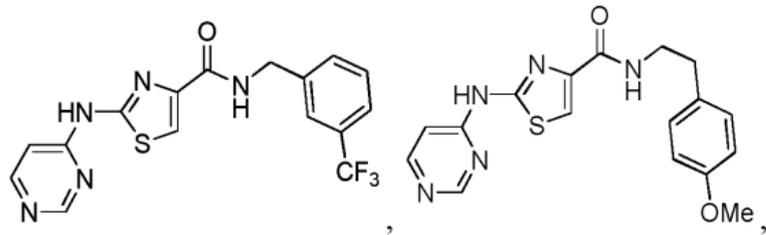
X es -N= o -CH=;

R¹ es hidrógeno; e

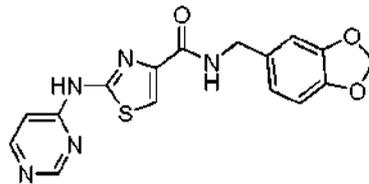
y y z son 0.

6. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

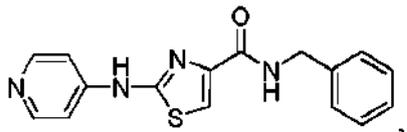
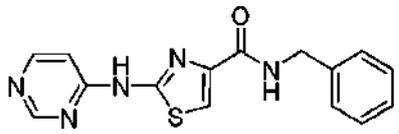




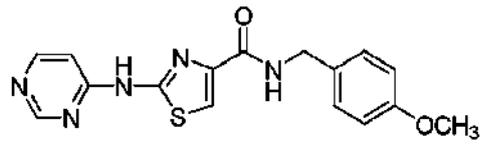
5
o



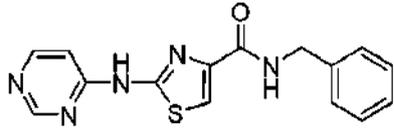
10 7. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



15
o



8. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



5

9. Un método para estabilizar una célula animal aislada *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto una célula animal con una cantidad suficiente de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para estabilizar la célula.

10

10. Un método para mantener la supervivencia celular, comprendiendo el método, generar células madre aisladas; e inducir la estabilización de E-cadherina en las células aisladas al poner en contacto las células madre aisladas con una cantidad de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 suficiente para mejorar la supervivencia de las células madre aisladas al menos 2 veces en comparación con la ausencia del compuesto, manteniendo de ese modo la supervivencia celular.

15

11. Una población de células aisladas que comprende una cantidad de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 suficiente para mejorar la supervivencia de células aisladas en al menos 2 veces en comparación con la ausencia del compuesto, y opcionalmente donde las células se seleccionan entre el grupo que consiste en células madre, células madre inducidas, células madre pluripotentes, células precursoras, células diferenciadas, células beta y fibroblastos.

20

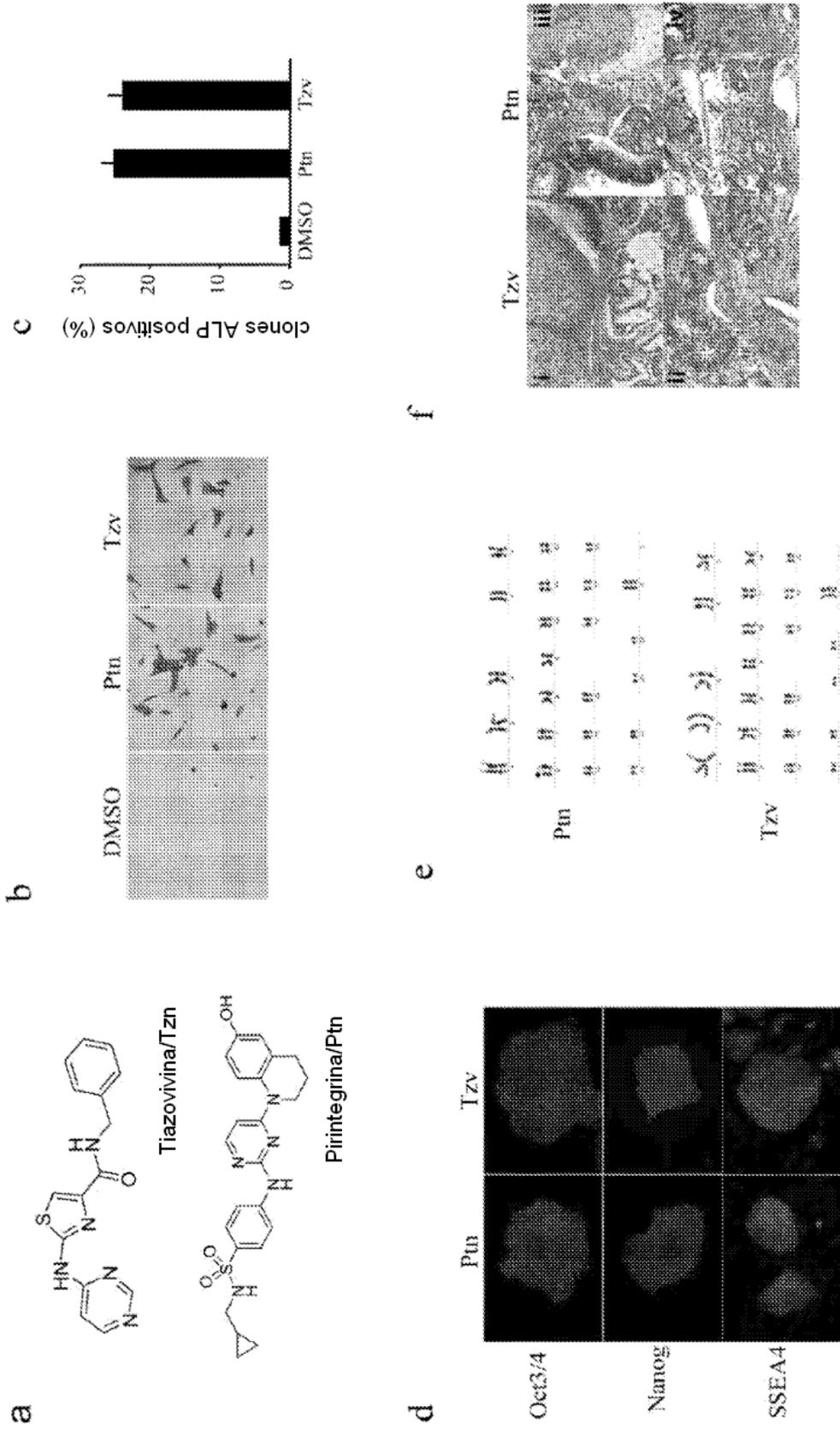


Figura 1

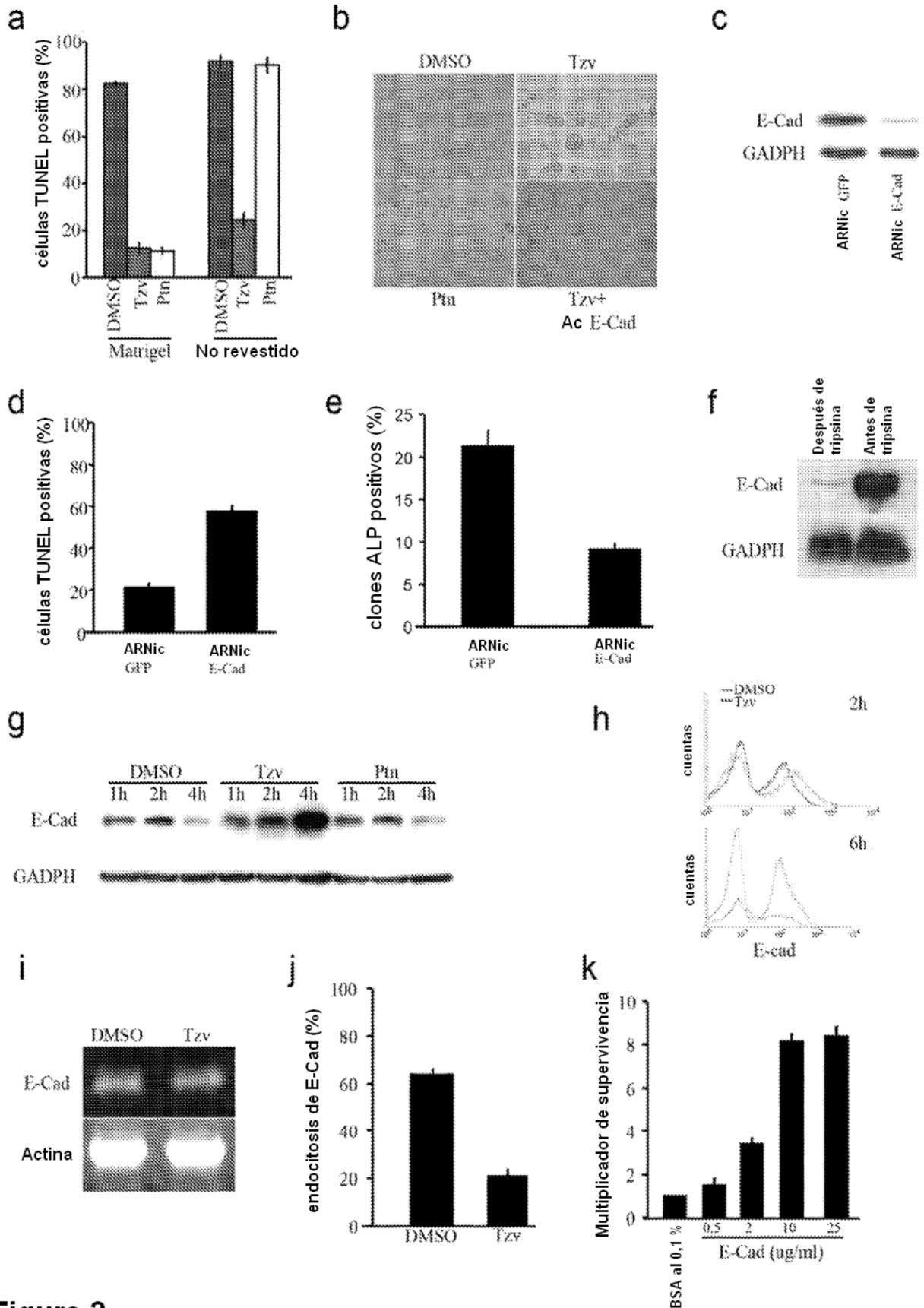


Figura 2

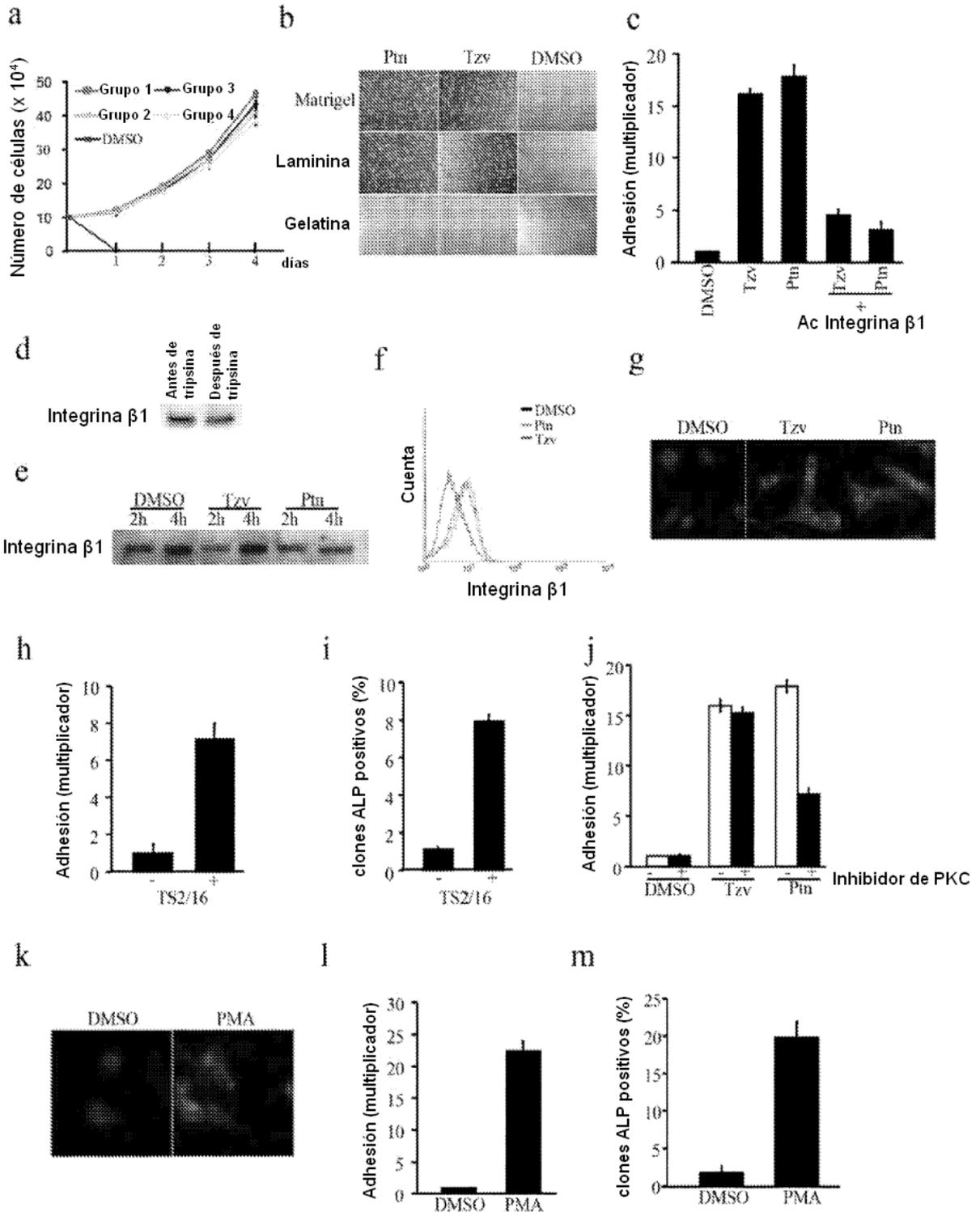


Figura 3

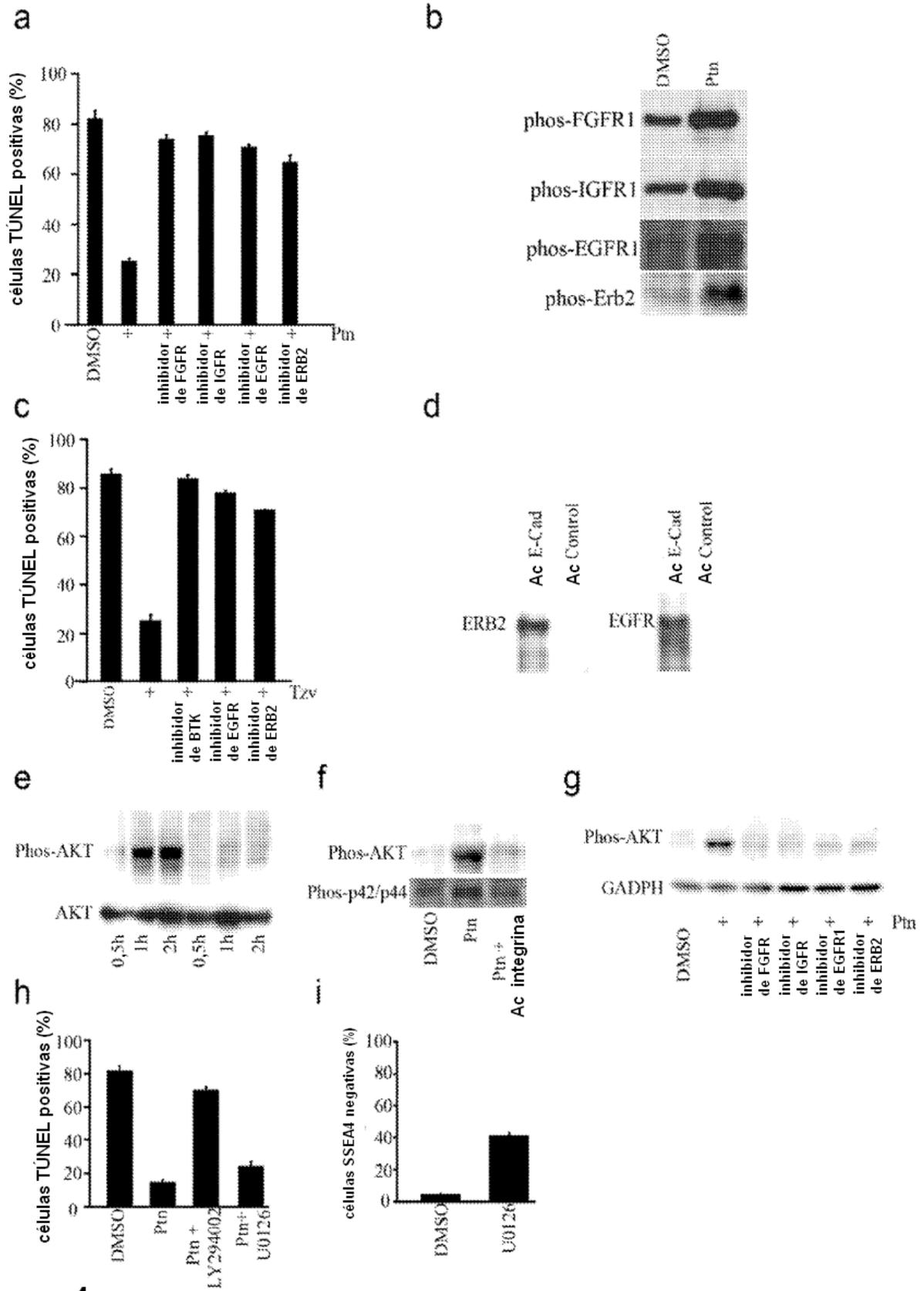
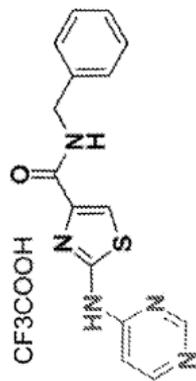


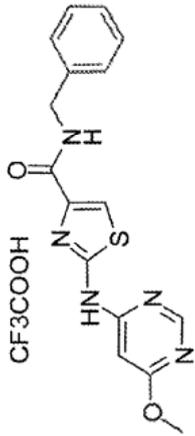
Figura 4

HHS-378 (Tiazovivina/Tzv)



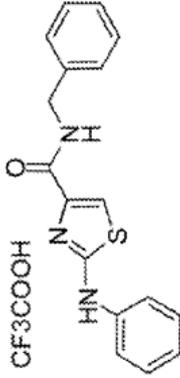
Masa exacta: 311,08
Peso molecular: 311,36

HHS-378-1



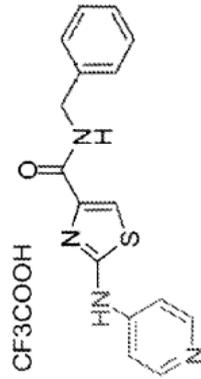
Masa exacta: 455,09
Peso molecular: 455,41

HHS-378-2



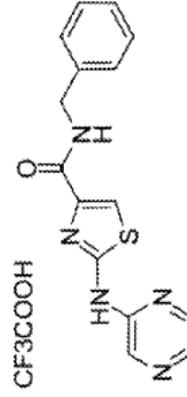
Masa exacta: 423,09
Peso molecular: 423,41

HHS-378-4



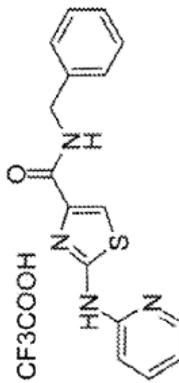
Masa exacta: 424,08
Peso molecular: 424,40

HHS-378-5



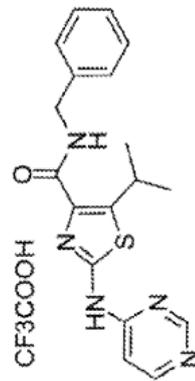
Masa exacta: 425,08
Peso molecular: 425,38

HHS-378-3



Masa exacta: 424,08 (*)
Peso molecular: 424,40 (*)

HHS-378-6



Masa exacta: 467,12
Peso molecular: 467,46

Figura 5A

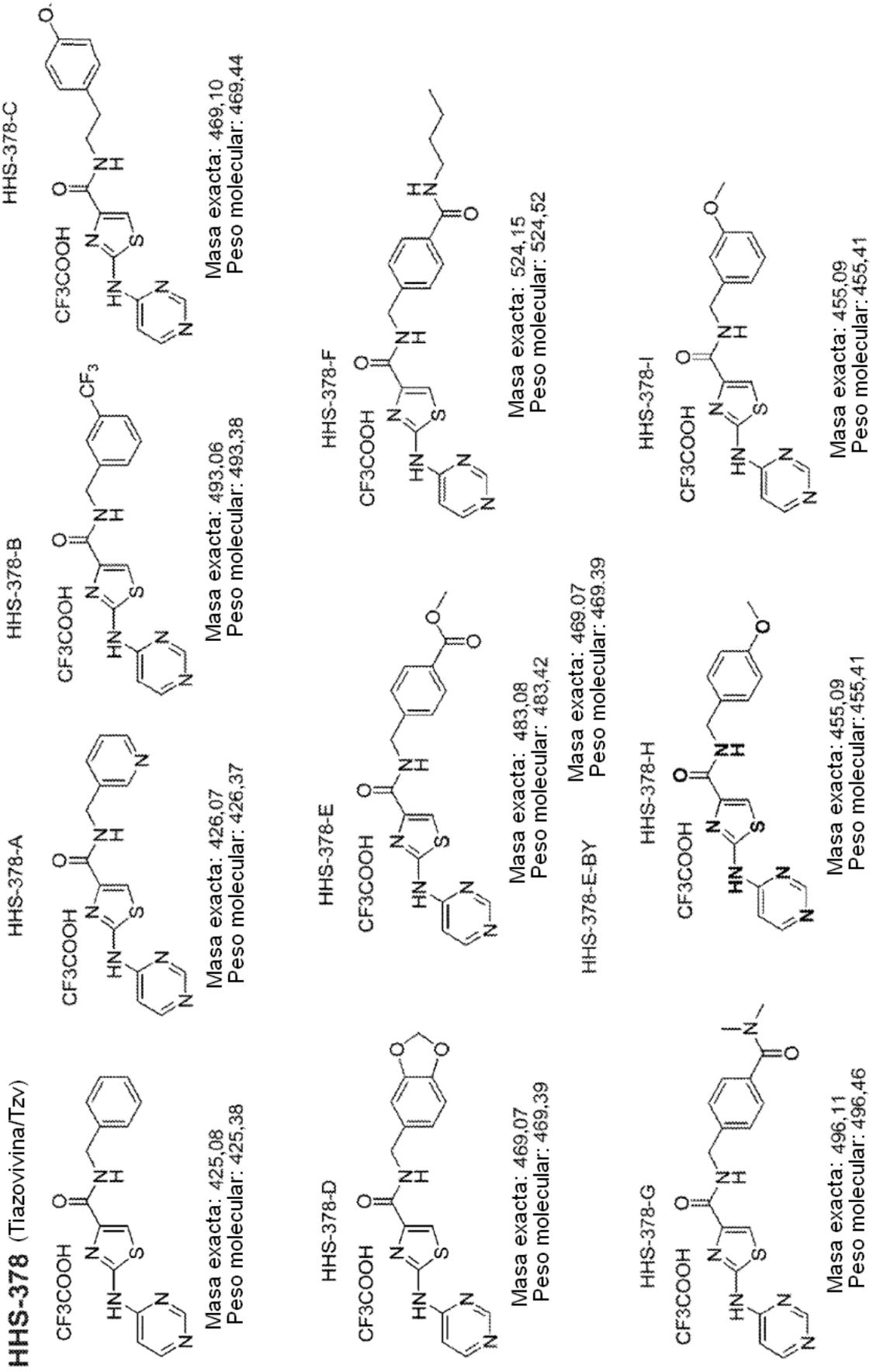


Figura 5B

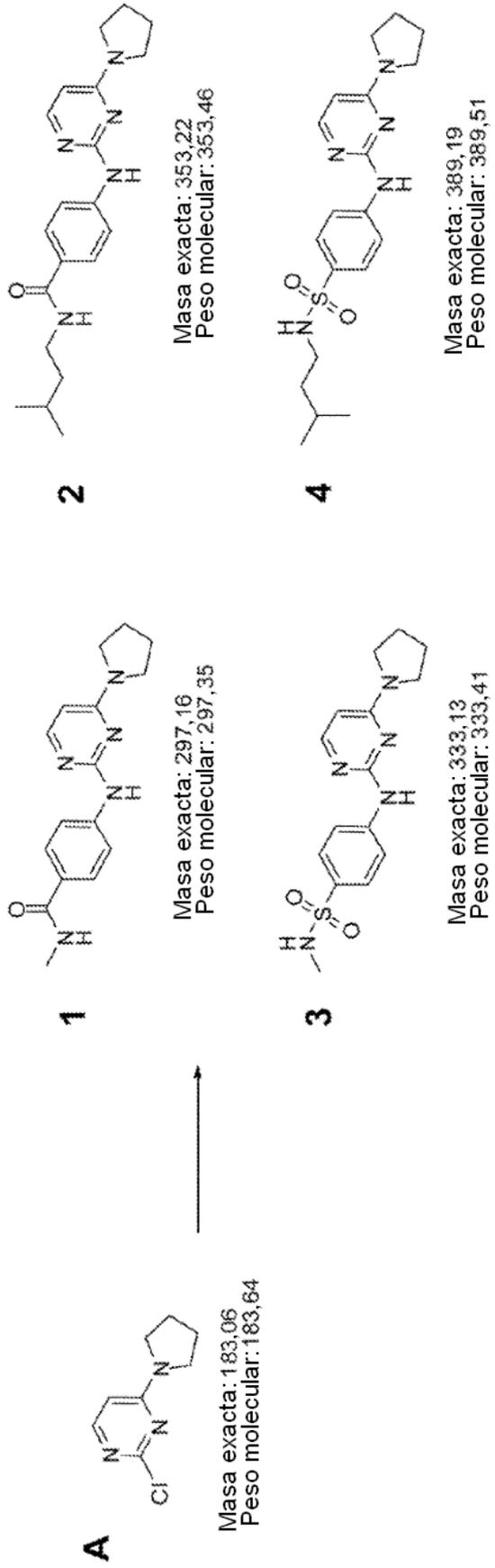


Figura 6A

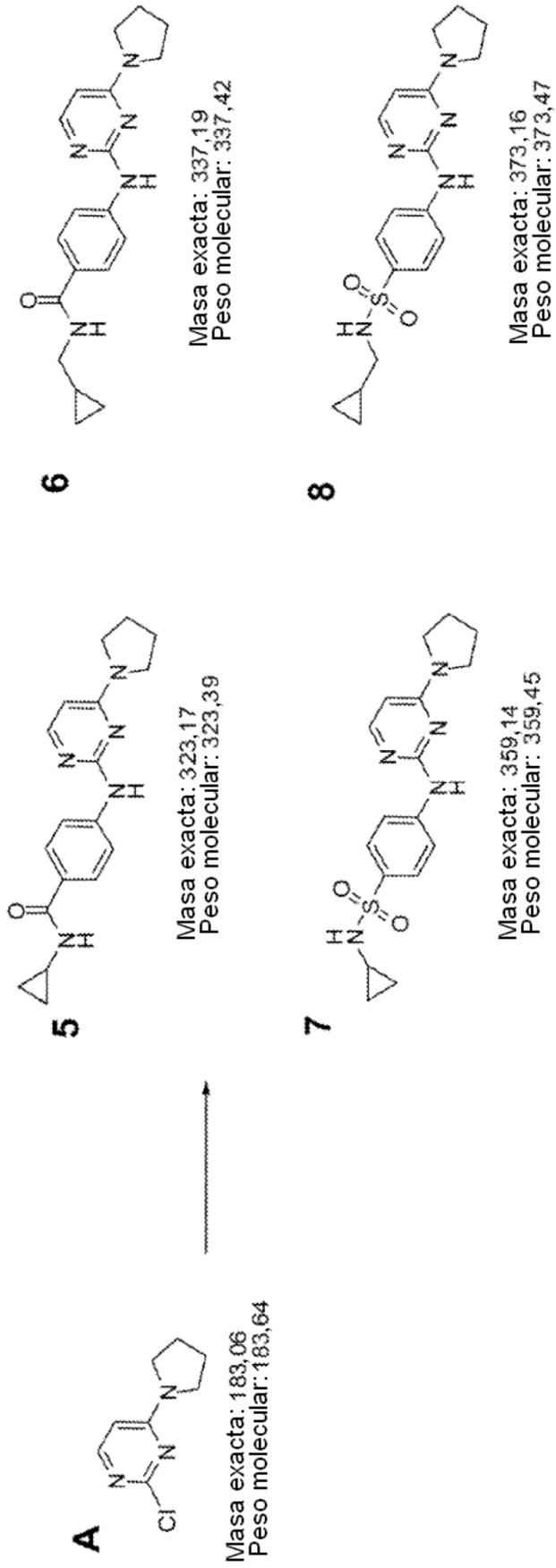


Figura 6B

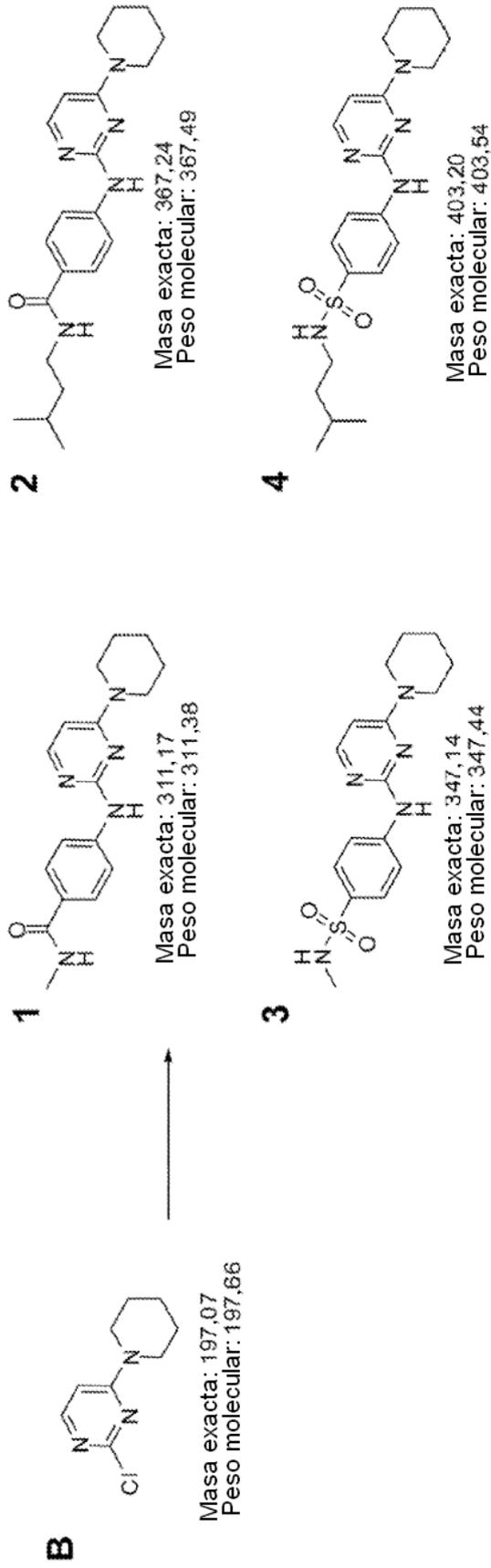


Figura 6C

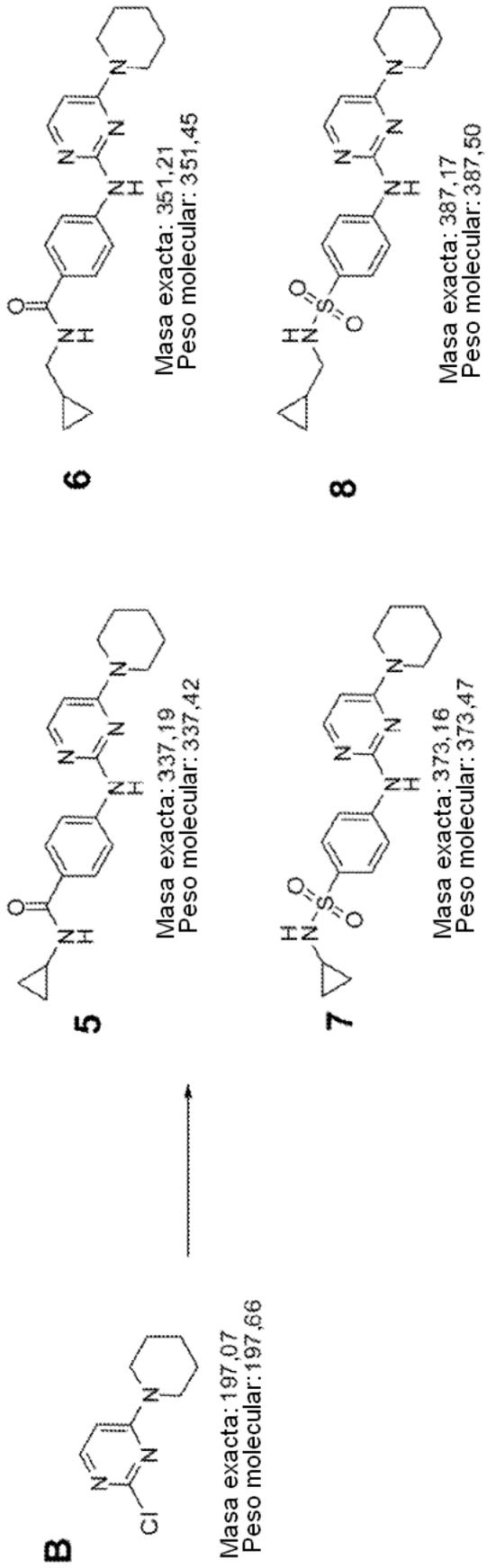


Figura 6D

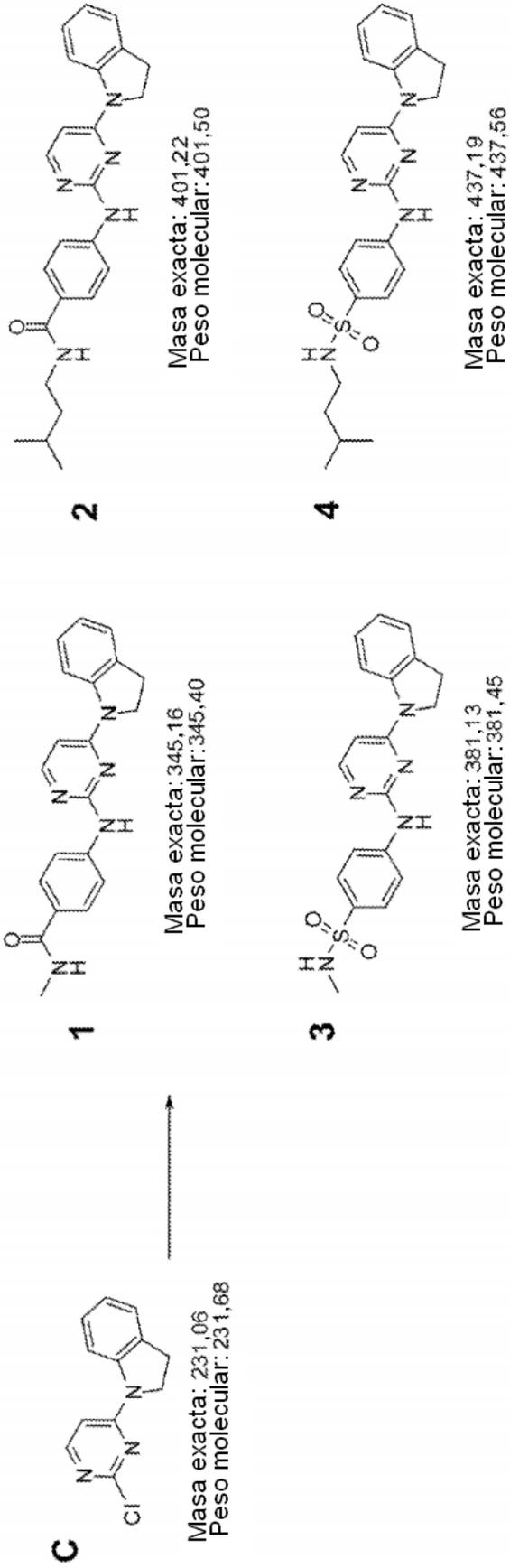


Figura 6E

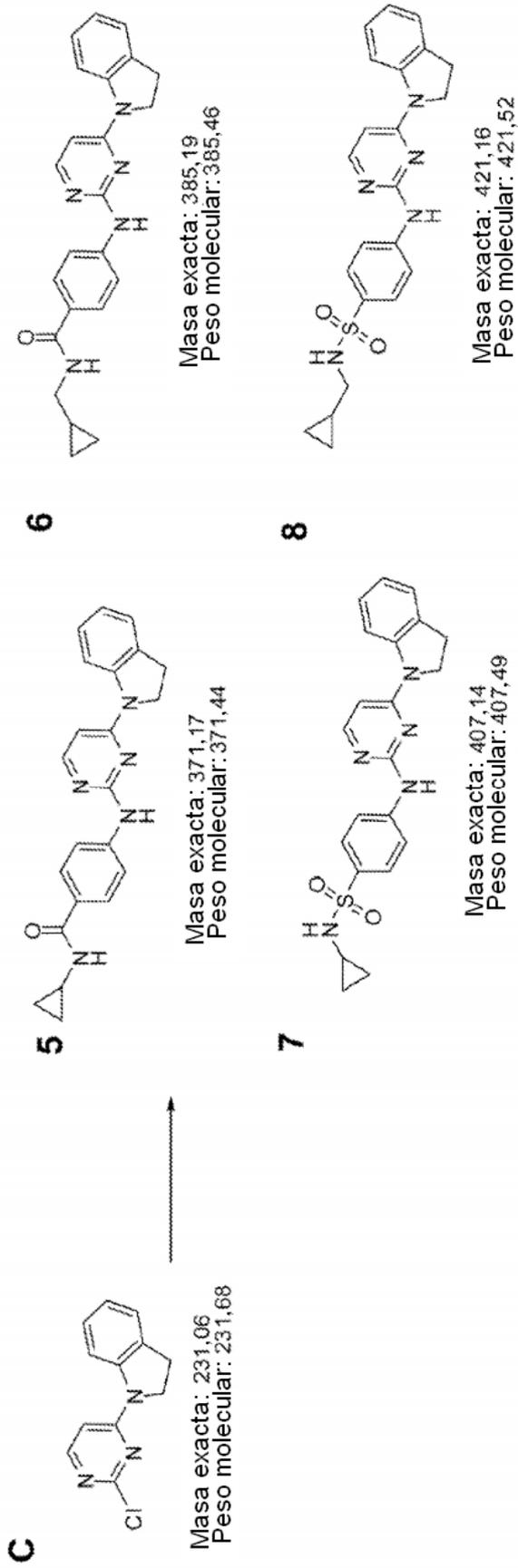


Figura 6F

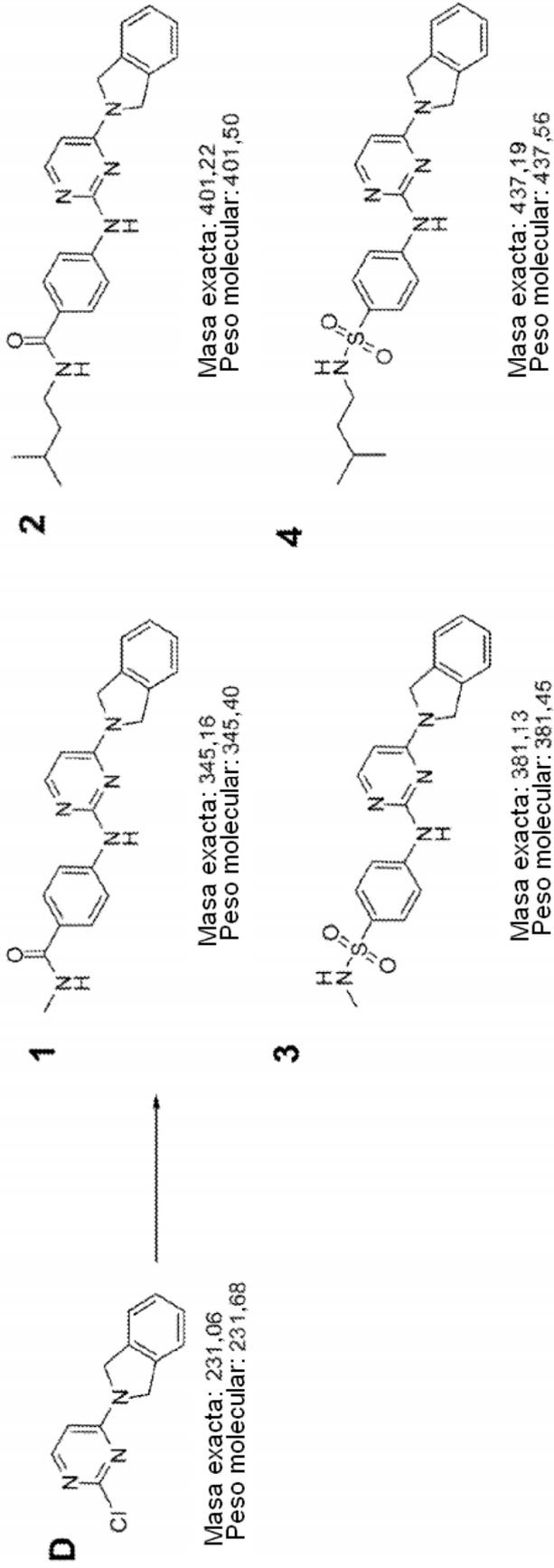


Figura 6G

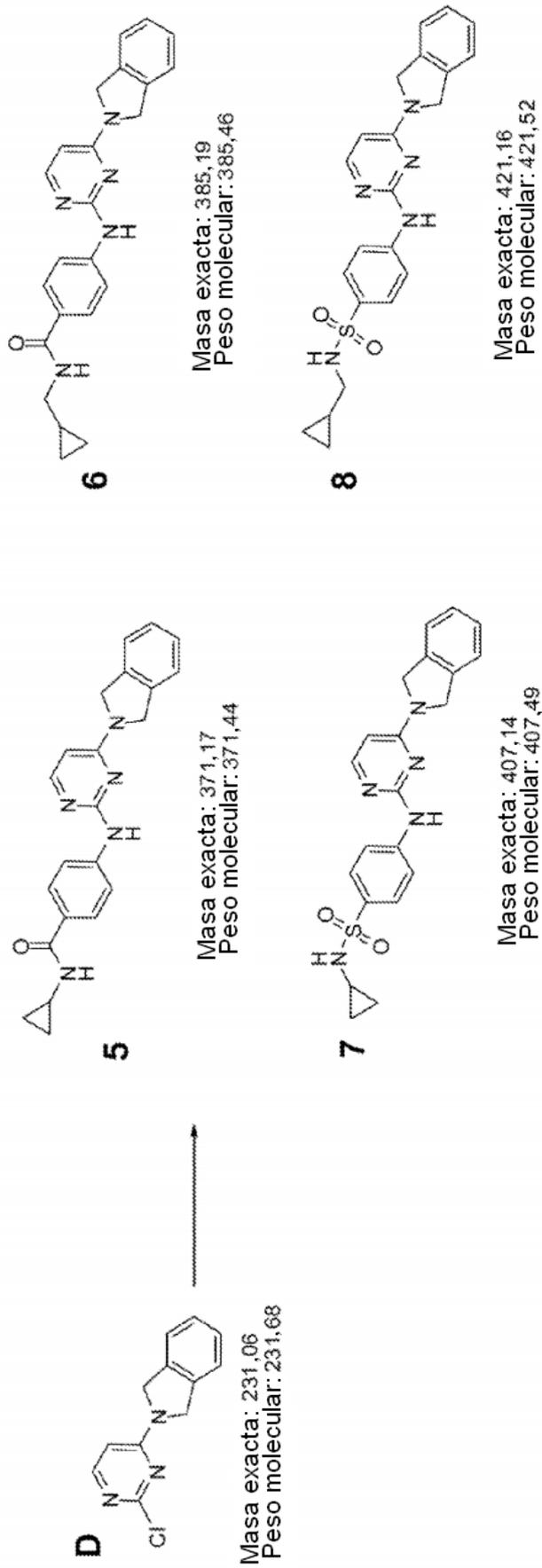


Figura 6H

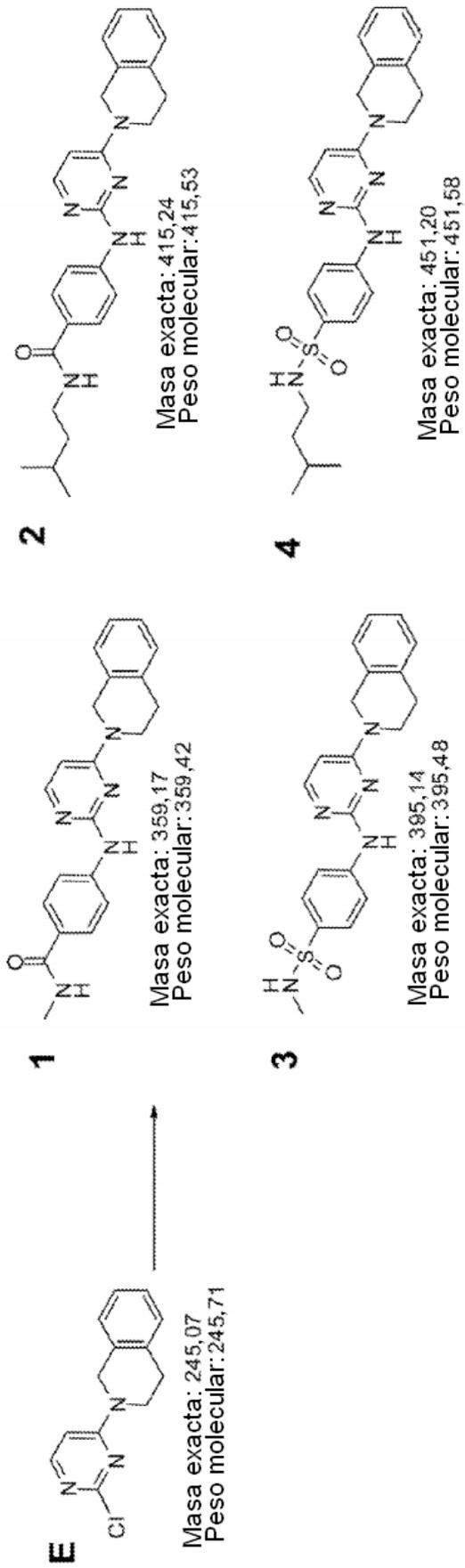


Figura 6I

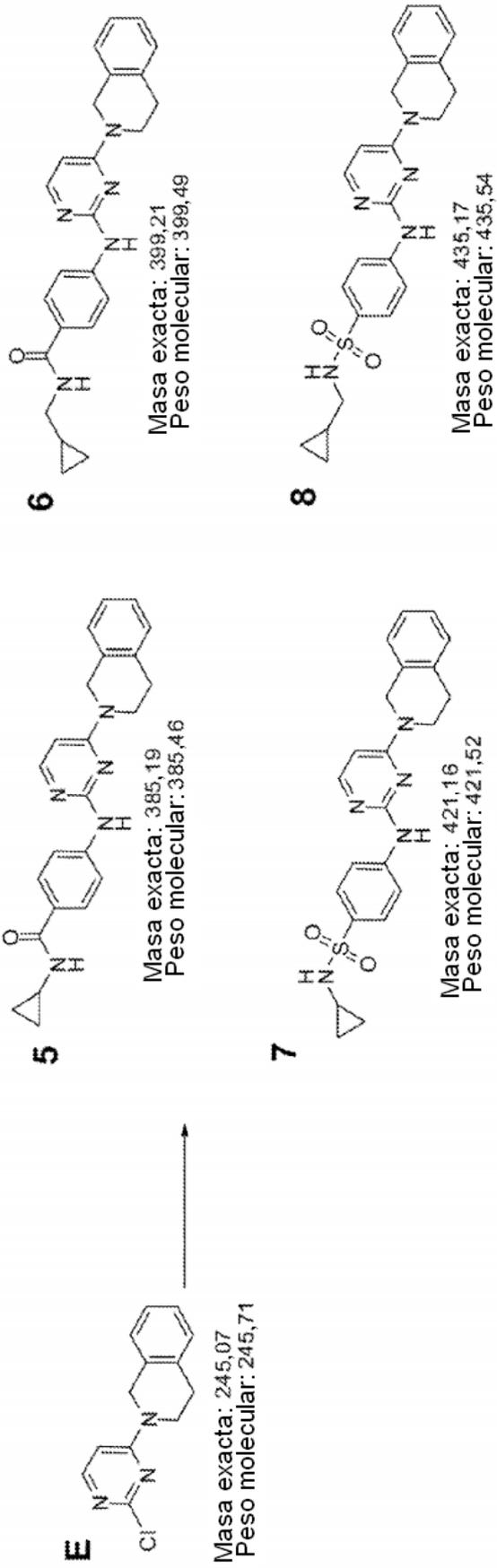


Figura 6J

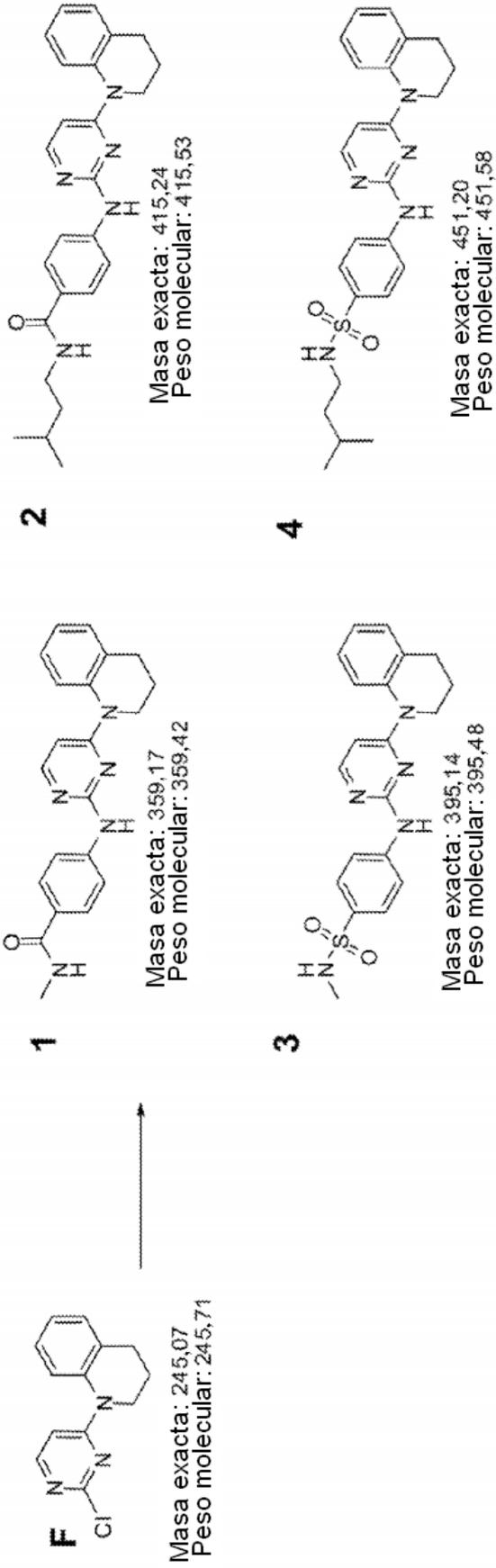


Figura 6K

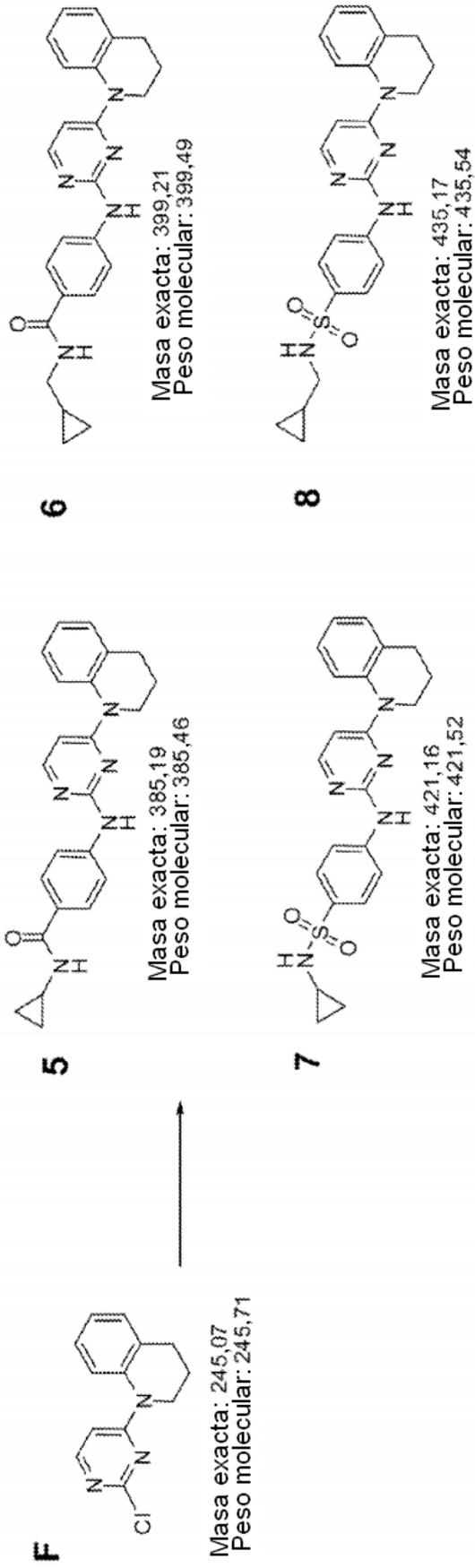


Figura 6L

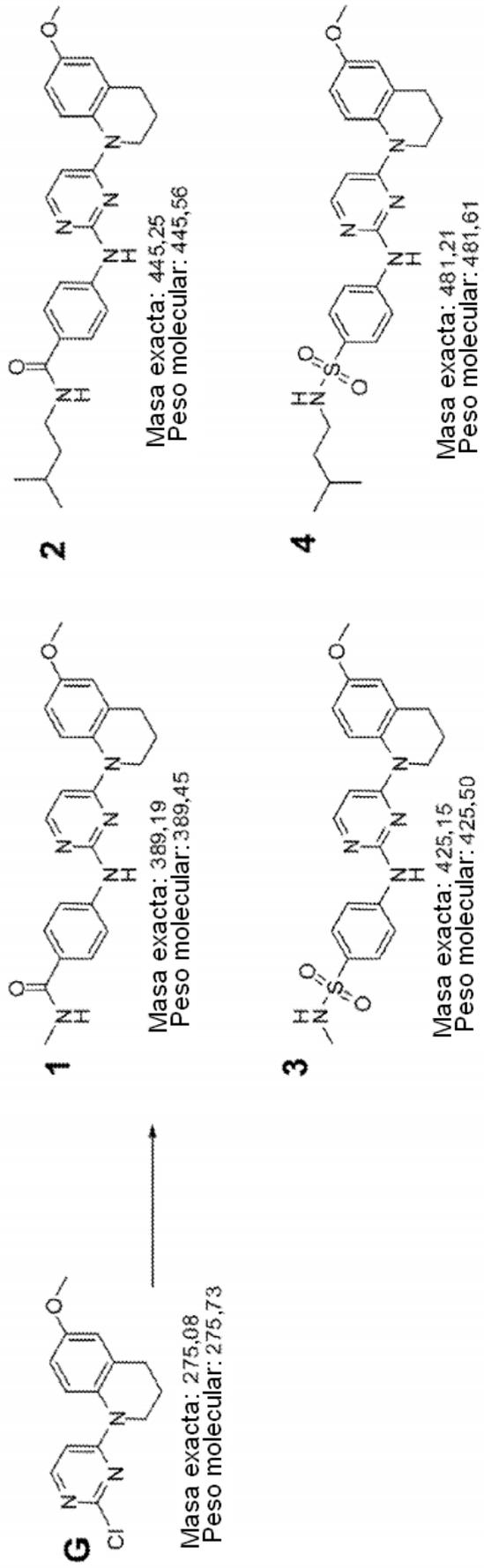


Figura 6M

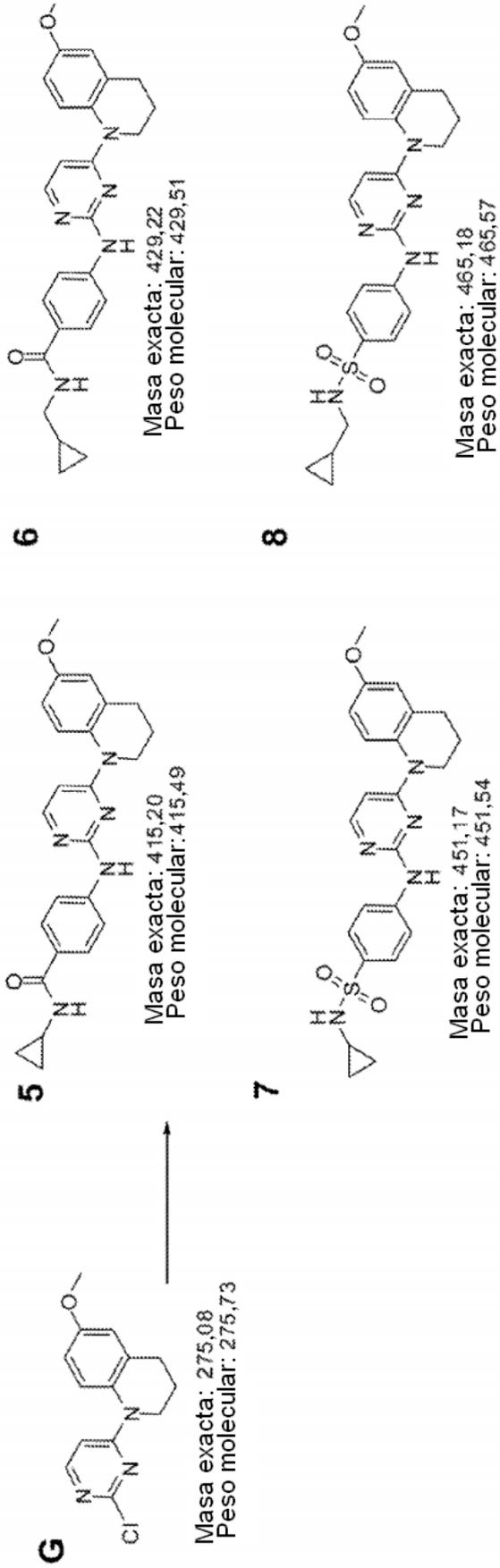


Figura 6N

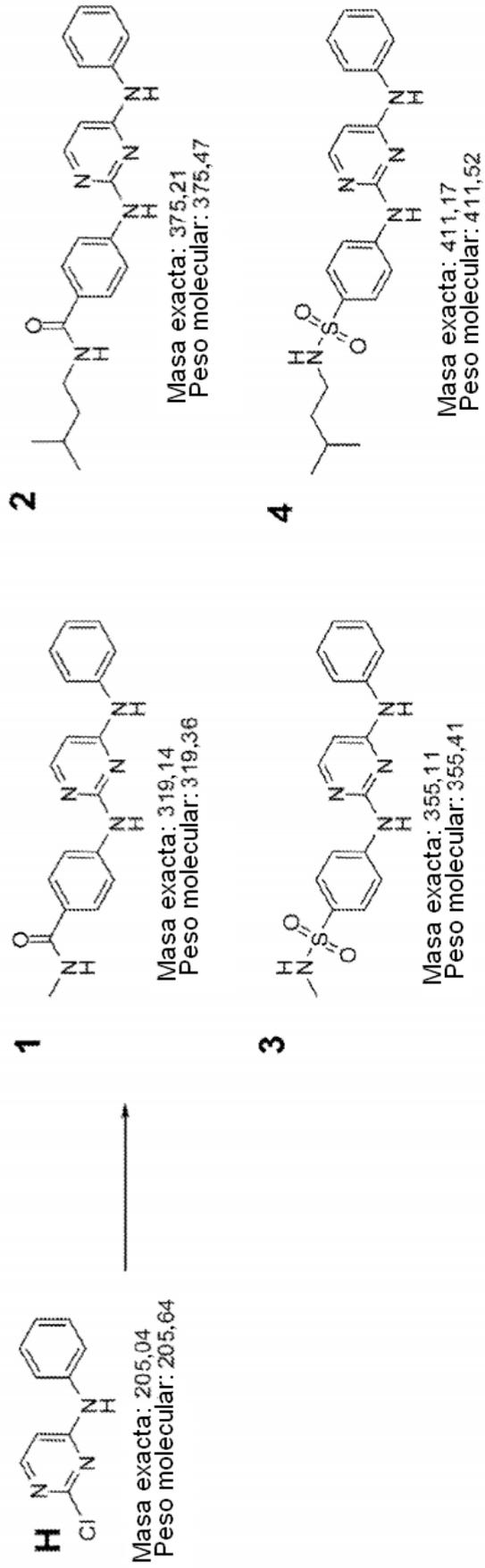


Figura 60

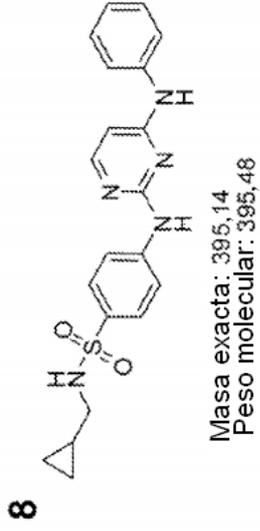
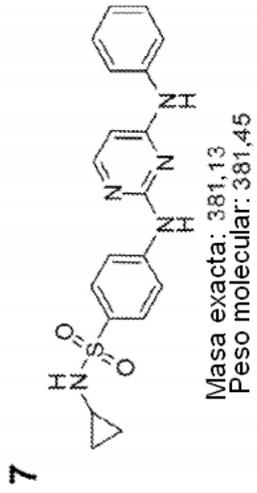
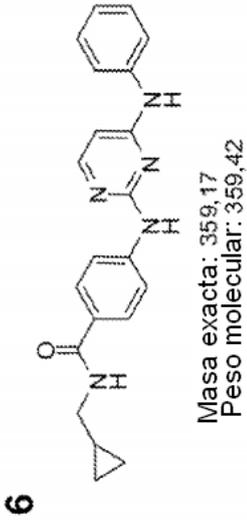
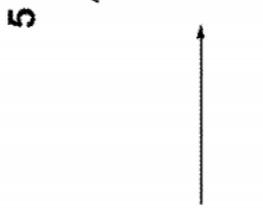
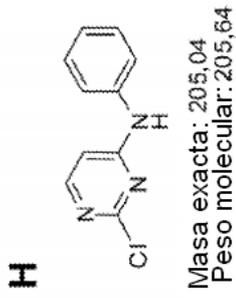


Figura 6P

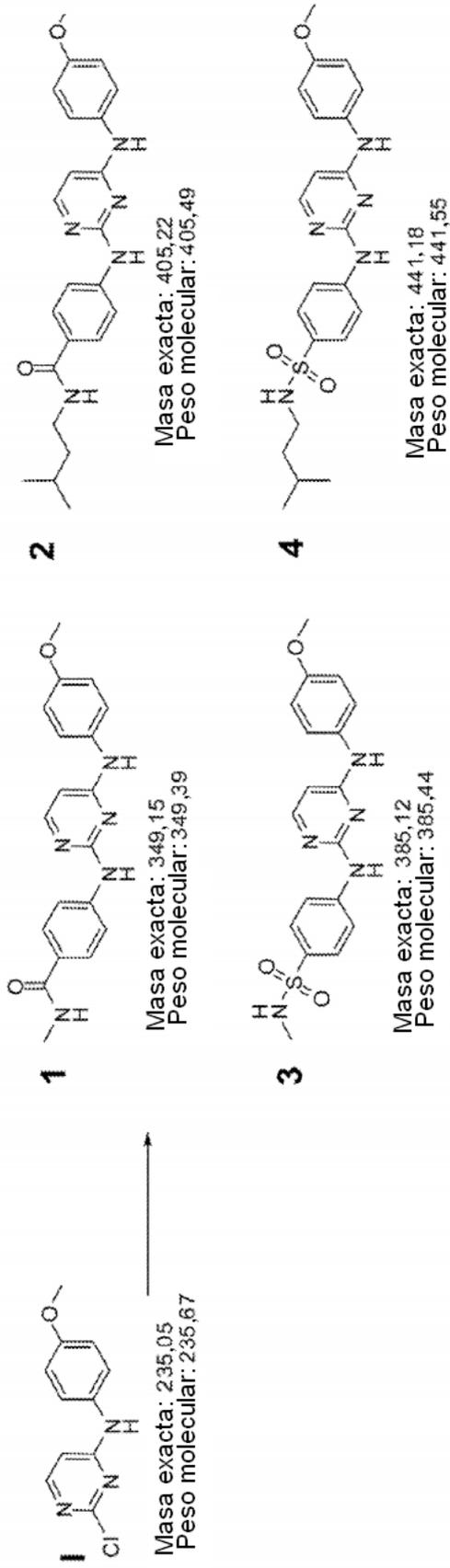


Figura 6Q



Figura 6R

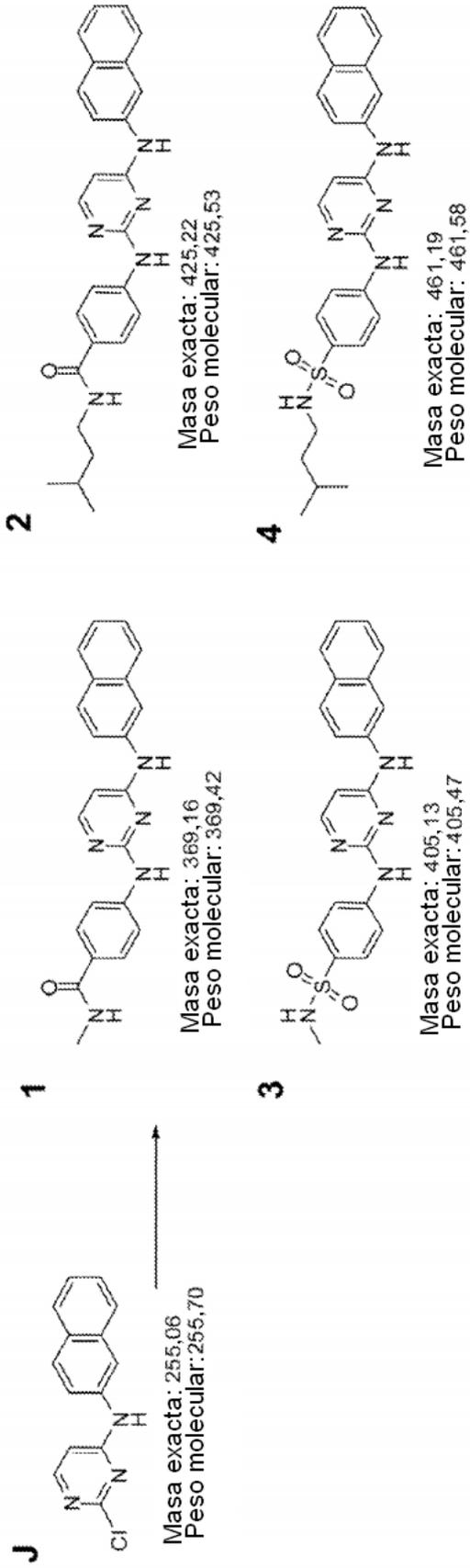


Figura 6S

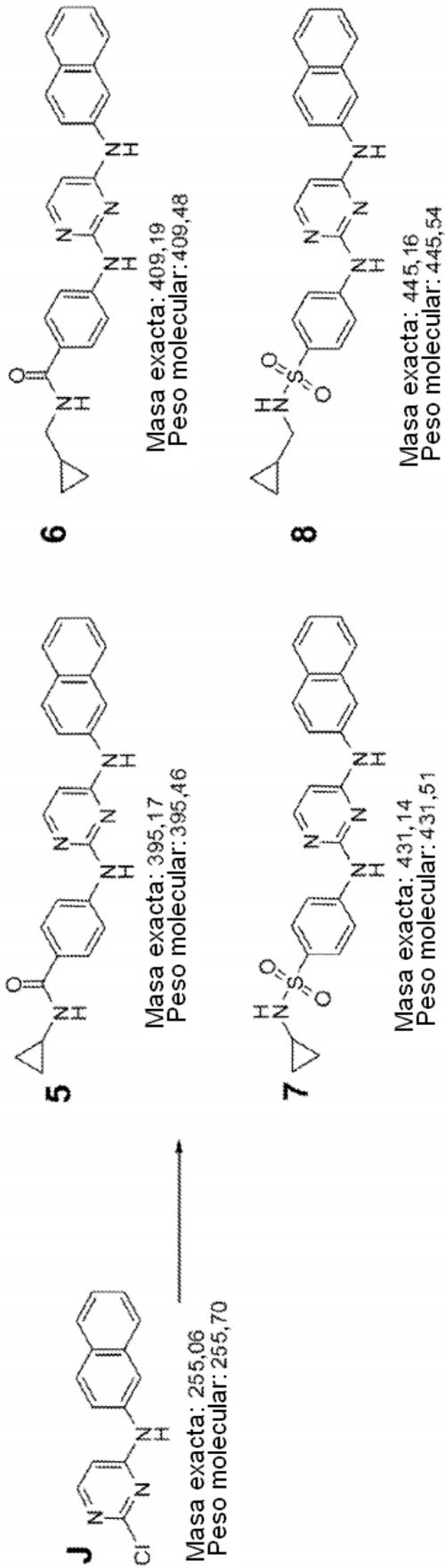


Figura 6T

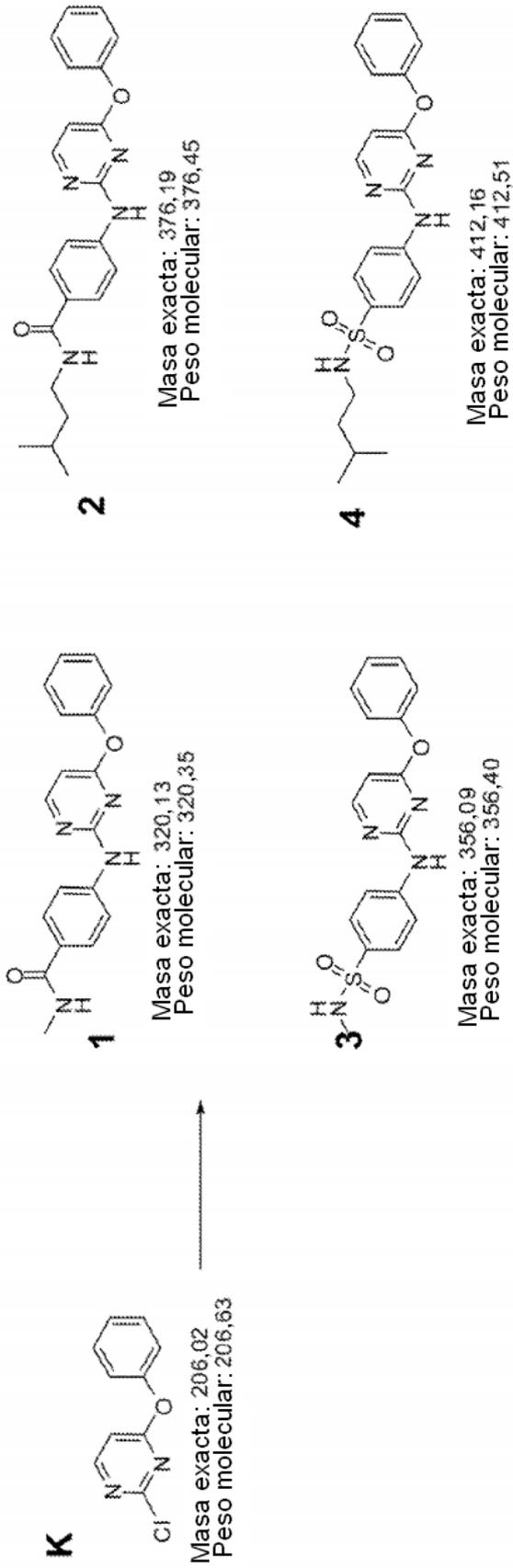


Figura 6U

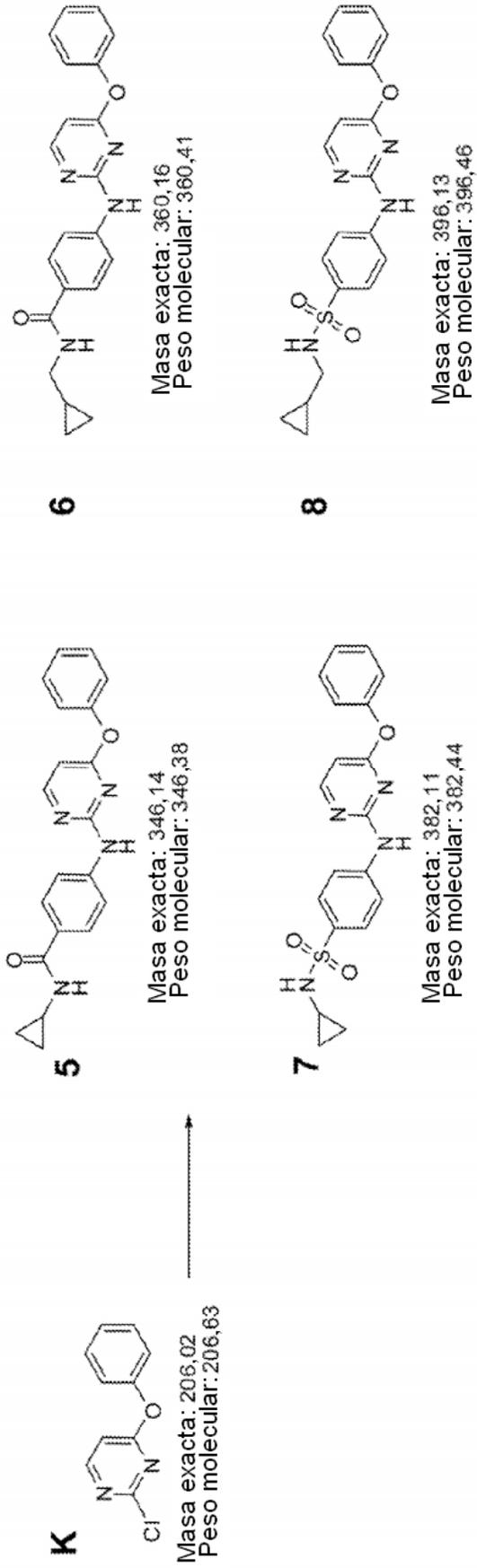


Figura 6V

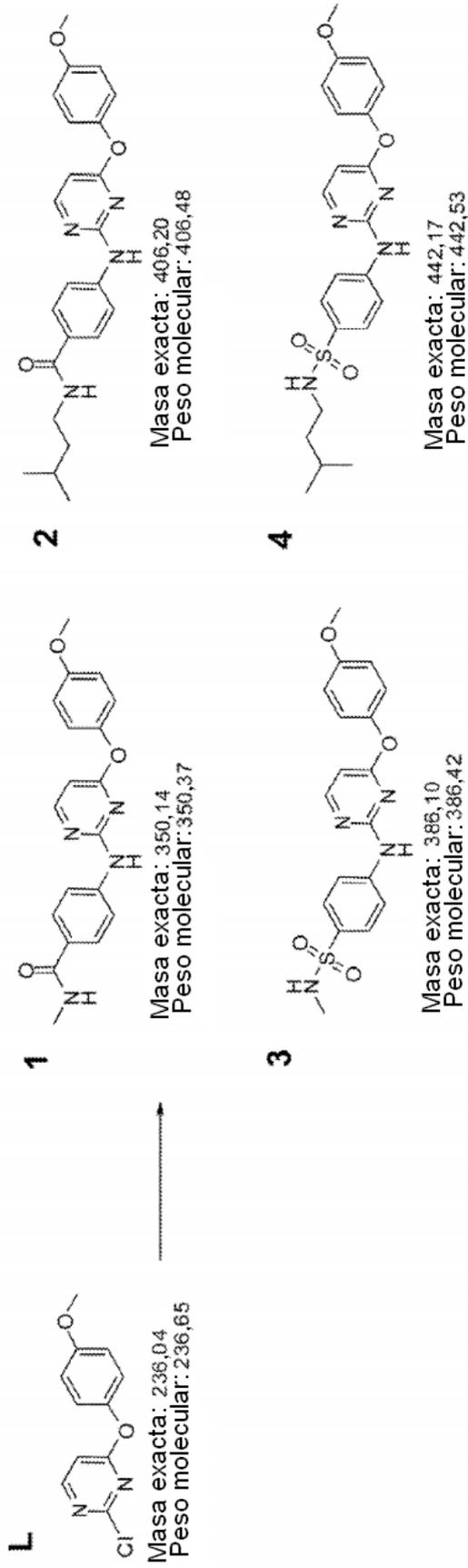


Figura 6W

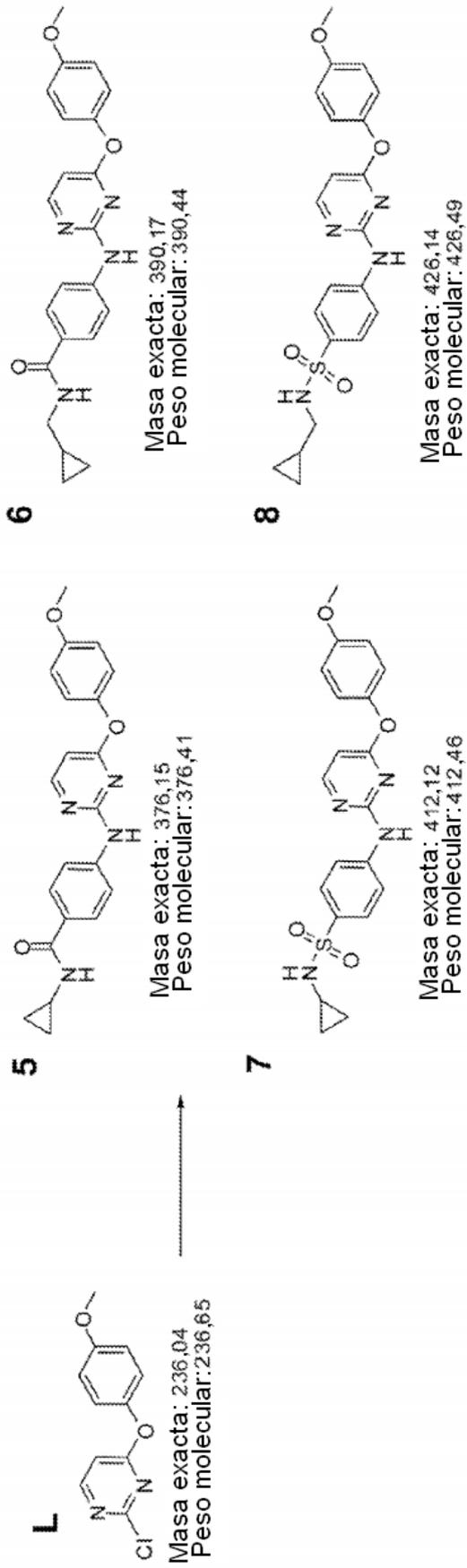


Figura 6X

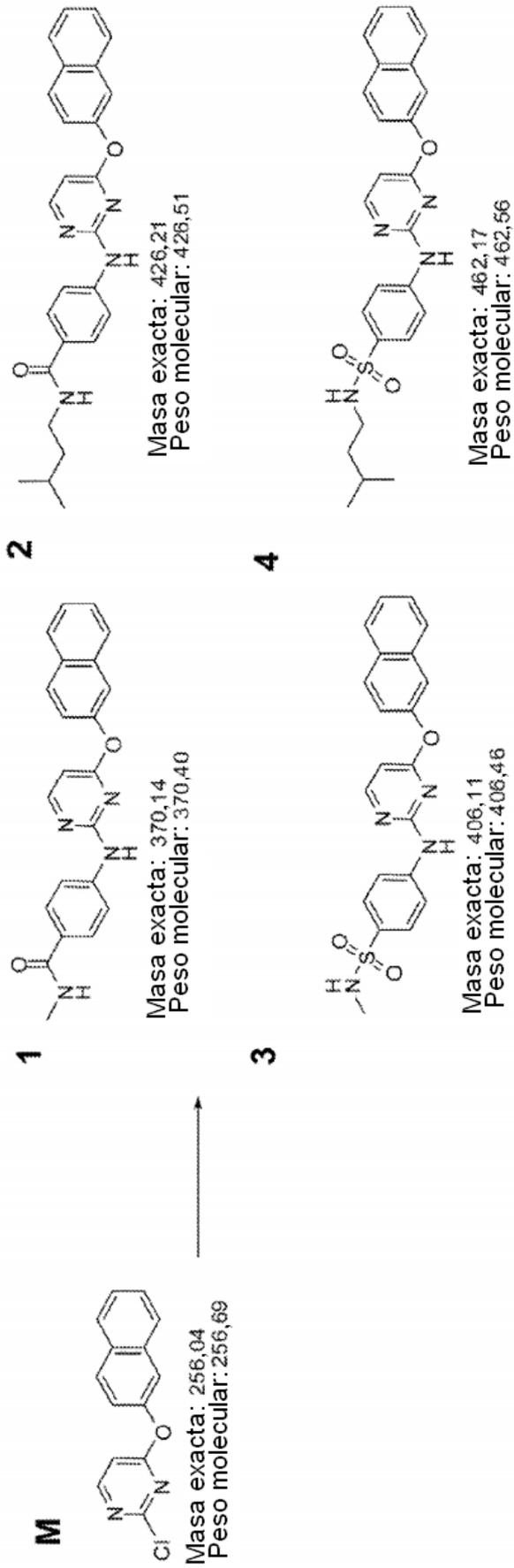


Figura 6Y

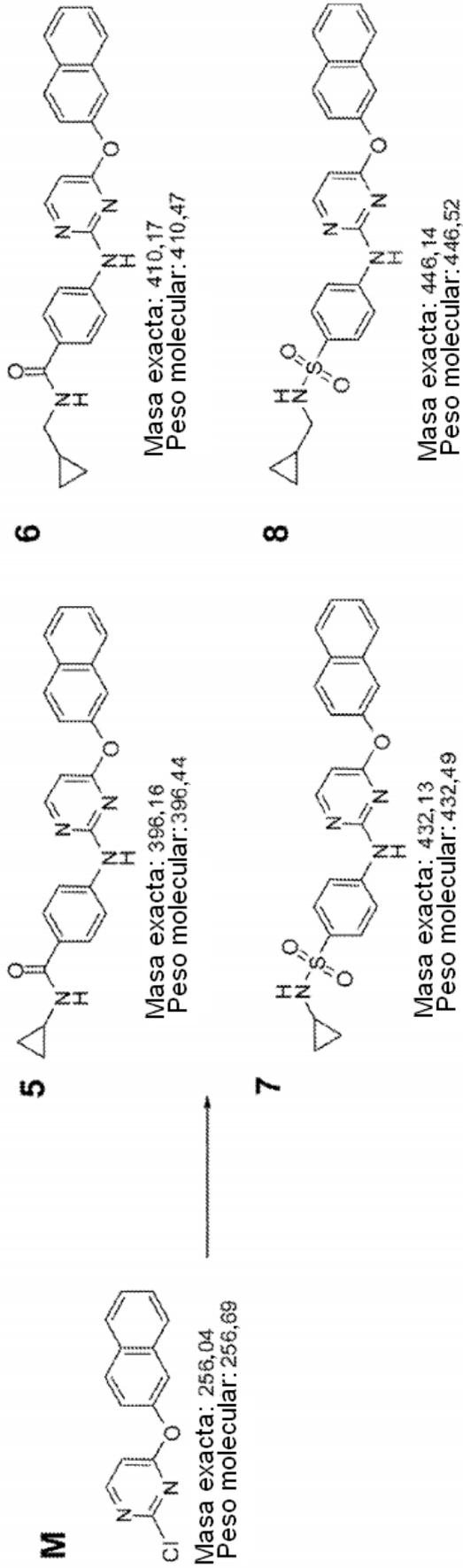


Figura 6Z

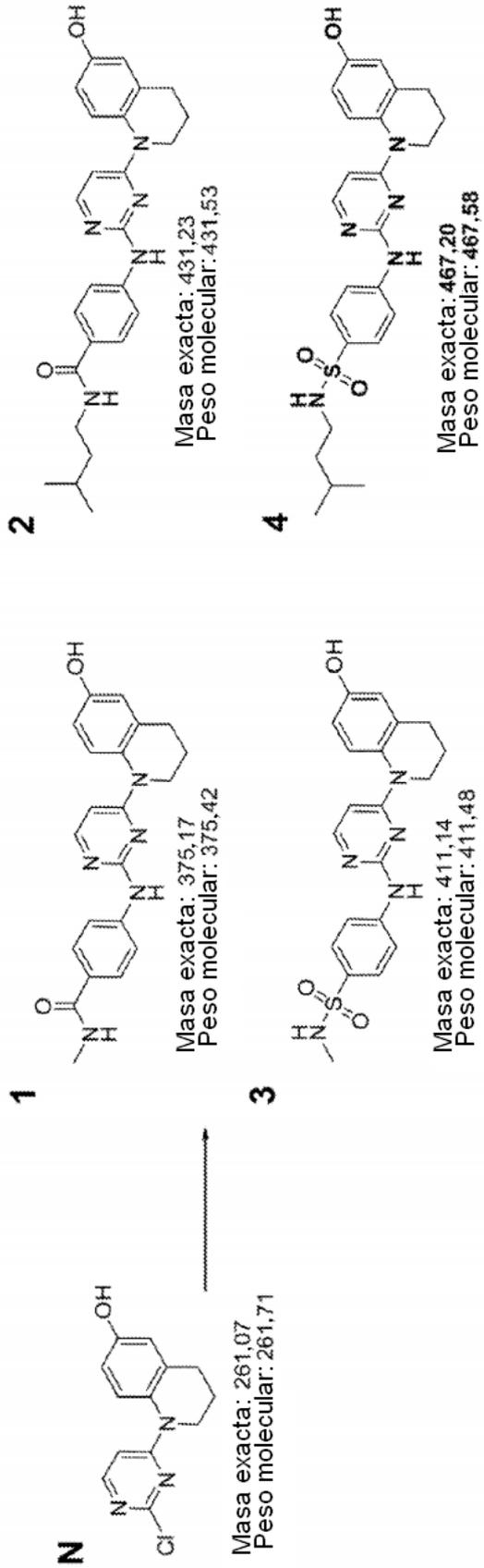


Figura 6AA

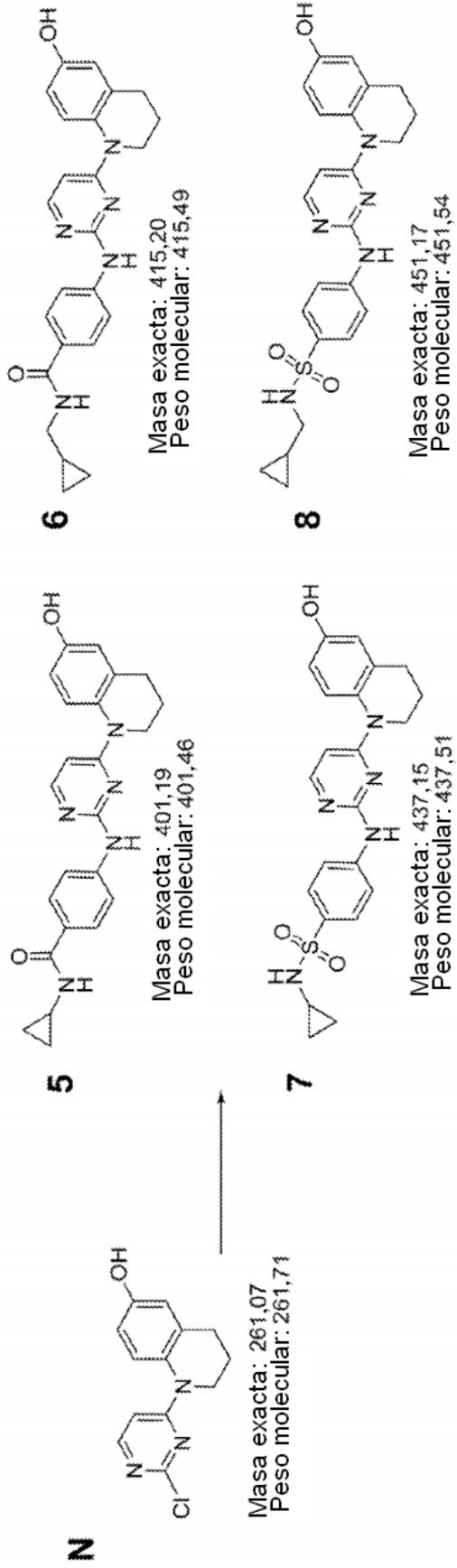


Figura 6AB

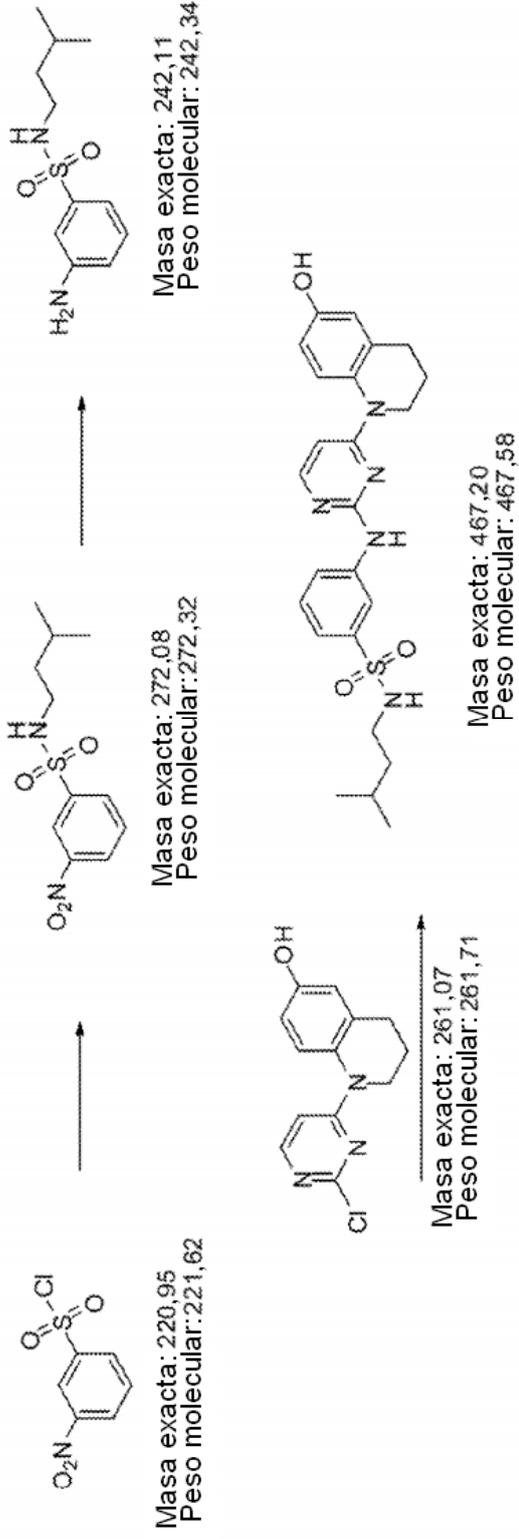


Figura 6AC