

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 074**

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 16174428 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019** **EP 3103804**

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:

09.05.2019

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:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 712 074 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).

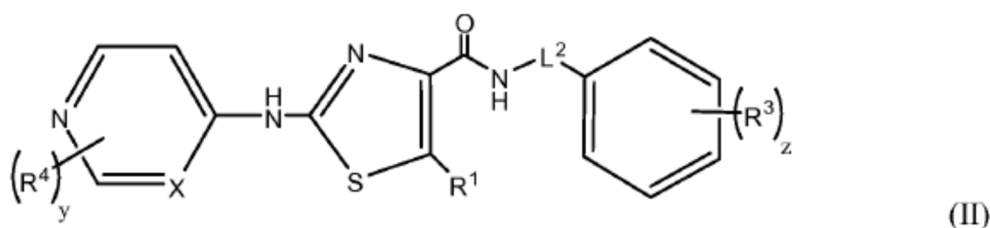
DESCRIPCIÓN

Cultivos de células madre

Las células madre embrionarias (ESC) son células pluripotentes que tienen la capacidad de autorrenovarse indefinidamente y de diferenciarse en todos los tipos celulares del cuerpo (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 usarán algún día para reemplazar a las células perdidas y dañadas, y proporcionarán terapias más allá del alcance de los fármacos convencionales. Sin embargo, para comprender totalmente los potenciales clínicos de las hESC, se tienen que establecer condiciones de cultivo robustas, químicamente definidas, sin células nutrientes ni productos animales. Aunque se han reportado varios medios químicamente definidos (Yao, S. et al., Proc Natl Acad Sci USA 103 (18):6907-6912 (2006); Lu, J. et al., Proc Natl Acad Sci USA 103 (15):5688-5693 (2006); Ludwig, T.E. et al., Nat Biotechnol 24 (2):185-187 (2006)), son todavía muy insatisfactorios debido al rendimiento subóptimo de las células en ellos. Especialmente bajo estas condiciones, cuando las células se subcultivan por tripsina a células individuales, experimentan una muerte celular extensa. Se conocen varias rutas de señalización que median la autorrenovación de las hESC, incluyendo FGF, TGF- β , 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 un factor de supervivencia en este proceso, cuyos mecanismos moleculares son elusivos. WO 2007/109045 describe compuestos orgánicos heterocíclicos que se dice que inhiben, regulan y/o modulan las proteínas tirosina y serina/treonina quinasas y semejantes a quinasas, tales como la quinasa RAF. WO 02/056888 describe un ensayo para la identificación y comparación de compuestos que tienen actividad como moduladores de la expresión y liberación de TNF- α , IL-1 o IL-6 en los seres humanos y animales en los que la modulación de la actividad catalítica de PRAK (proteína quinasa regulada/activada por p38) se emplea para la identificación y comparación de compuestos de ensayo. US 7 265 138 describe ligandos del receptor vanilloide y su posible uso en el tratamiento de enfermedades.

25 Breve compendio de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto que tiene la fórmula:



y células aisladas que comprenden células madre, células progenitoras, o células diferenciadas de ellas,

en donde L^2 es alquileo C_1-C_6 no sustituido; 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 no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido; R³ es OR¹⁸, y R¹⁸ es hidrógeno o alquilo C_1-C_{10} no sustituido; 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 no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en 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 no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

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

En algunas realizaciones, L^2 es metileno.

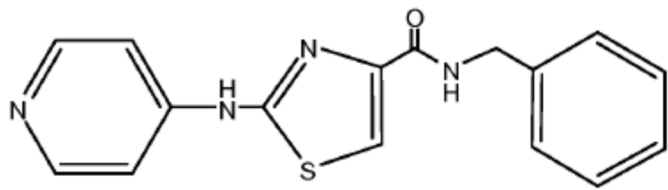
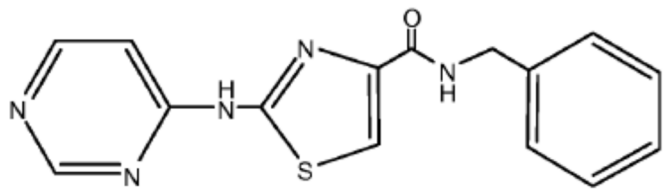
En algunas realizaciones, X es -N= o -CH=.

En algunas realizaciones, z es 1.

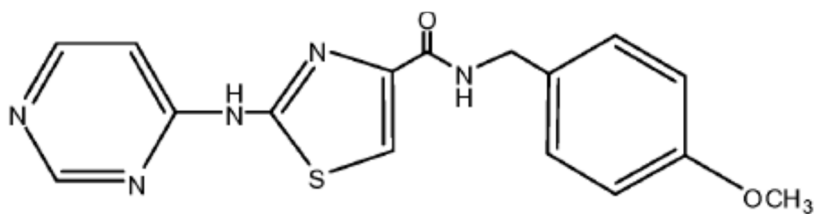
45 En algunas realizaciones, y es 0 o 1.

En algunas realizaciones, L^2 es metileno, X es -N= o -CH=; R¹ es hidrógeno; e y y z son 0.

En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (II) tiene la fórmula:



o



- 5 La presente invención también proporciona un medio de cultivo celular que comprende un compuesto de fórmula (II), como se ha definido anteriormente, o un racemato, diastereómero, tautómero, o un isómero geométrico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona un método para aumentar la supervivencia y proliferación celulares, método que comprende:

- 10 (a) obtener células aisladas que comprenden células madre, células progenitoras, o células diferenciadas de ellas; y
 (b) poner en contacto las células aisladas con una cantidad de un compuesto que tiene la fórmula (II) suficiente como para mejorar la supervivencia de las células al menos 2 veces comparado con la ausencia del compuesto, en donde el compuesto que tiene la fórmula (II) es como se ha definido anteriormente, o es un racemato, diastereómero, tautómero, o un isómero geométrico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 15 En algunas realizaciones, el método permite la estabilización de una célula aislada *in vitro*. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula animal con una cantidad suficiente de un compuesto de fórmula (II) como para estabilizar la célula.

- 20 En algunas realizaciones, el método comprende además cambiar las condiciones o entorno de la célula en presencia del compuesto, en donde la etapa de cambio en ausencia del compuesto resultaría en 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.

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 El método puede comprender aislar las células de un animal. El animal puede ser un ser humano. El animal puede ser un animal no humano.

En algunas realizaciones, el método comprende generar células madre, células progenitoras, o células diferenciadas aisladas; e inducir la estabilización de E-cadherina en las células aisladas, mantenimiento de esta manera la supervivencia celular.

- 30 En algunas realizaciones, la etapa de inducción comprende cultivar las células madre aisladas en una superficie, en donde una molécula que comprende un ectodominio de E-cadherina se ancla a la superficie.

En algunas realizaciones, el método comprende generar células aisladas; y activar la proteína quinasa C (PKC) en las

células aisladas, manteniendo de esta manera la supervivencia celular.

En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende una cantidad de un compuesto de fórmula (II) que estabiliza a la E-cadherina en las células, suficiente como para mejorar la supervivencia de las células aisladas al menos 2 veces comparado con la ausencia del compuesto.

- 5 En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende una cantidad de un compuesto de fórmula (II) suficiente como para mejorar la supervivencia de las células aisladas al menos 2 veces comparado con la ausencia del compuesto.

Definiciones

10 Las abreviaturas usadas en la presente memoria tienen su significado convencional en las técnicas química y biológica.

El término "estabilizar una célula" se refiere a reducir o eliminar sustancialmente la respuesta de una célula a un cambio en las condiciones o entorno a las que está expuesta la célula. "Reducir sustancialmente" en este contexto significa que la respuesta es al menos un 50 % menor de lo que sería en ausencia de un componente estabilizante (p. ej., los compuestos de fórmula (II)).

15 El término "cambiar las condiciones o entorno de una célula" se refiere a cambiar la temperatura, medio de cultivo (p. ej., fuente de carbono, concentración de sal, factor de crecimiento), disociar las células en células aisladas, descongelar las células, o cambiar de otra forma un factor del entorno inmediato de una célula. Como se discute en la presente memoria, cambiar las condiciones o entorno de una célula cambiará frecuentemente el fenotipo de una 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 determinados cambios tales como aislamiento, descongelación, etc. Así, el cambio de las condiciones puede reducir o eliminar la viabilidad celular, mientras las células estabilizadas como se describe en la presente memoria no tienen sustancialmente una viabilidad reducida bajo los mismos cambios de condición. El cambio en la programación de una célula también puede monitorizarse como la respuesta de una célula a un estímulo específico que es característico para un determinado tipo celular y/o como por la expresión de uno o un conjunto de genes o productos génicos característicos. Como un ejemplo no limitativo, las células madre pluripotentes humanas se sabe que expresan al menos algunos, y opcionalmente todo, 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. Dicha expresión puede cambiar al perder una célula madre la pluripotencia o diferenciarse de otra forma. Una célula madre pluripotente humana estabilizada mantendrá su patrón de expresión característico después de un cambio en la condición.

30 Una célula "aislada" se ha separado sustancialmente o purificado de otras células de un organismo.

El término "disociar" células se refiere a un proceso de aislar células de otras células o de una superficie (p. ej., una superficie de una placa de cultivo). Por ejemplo, las células pueden disociarse de un animal o tejido por métodos mecánicos o enzimáticos. Alternativamente, las células que se agregan *in vitro* pueden disociarse unas de otras. En otra alternativa más, las células adherentes se disocian de una placa de cultivo u otra superficie. La disociación puede implicar así la rotura de las interacciones de la célula con la matriz extracelular (ECM) y sustratos (p. ej., superficies de cultivo) o la rotura de la ECM entre las células.

40 "Determinar un fenotipo de una célula" se refiere a evaluar una cualidad o característica de la célula. Los fenotipos pueden incluir, por ejemplo, la 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.

Cuando se especifican los grupos químicos sustituyentes por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, engloban igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, p. ej., $-\text{CH}_2\text{O}-$ es equivalente a $-\text{OCH}_2-$.

45 El término "alquilo", en sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a no ser que se afirme otra cosa, una cadena lineal (es decir, no ramificada) o ramificada, o 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, C_1 - C_{10} significa uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen, pero no están limitados 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 semejantes. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no están limitados 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. Los grupos alquilo preferidos son grupos alquilo C_{1-6} .

55 El término "alquileo" en sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alquilo, como se ejemplifica, pero limitado, por $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Típicamente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, con aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono estando ejemplificados

en la presente invención. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo con una cadena más corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono. Los grupos alquileo preferidos son grupos alquileo C₁₋₆.

5 El término "heteroalquilo", en sí mismo o en combinación con otro término, significa, a no ser que se afirme otra cosa, una cadena lineal o ramificada estable, o radical hidrocarburo cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en al menos un átomo de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, P, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y de azufre pueden estar oxidados opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar cuaternizado. El o los 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 están limitados a, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, -CH=CH-N(CH₃)-CH₃, O-CH₃, -O-CH₂-CH₃, y -CN. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tal como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De forma similar, el término "heteroalquileo" en sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no limitado, por, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden estar situados en cualquiera o ambos extremos de la cadena (p. ej., alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, y semejantes). Además, para los grupos de unión alquileo y heteroalquileo, no se implica ninguna orientación del grupo conector por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo conector. Por ejemplo, la fórmula -C(O)₂R' representa tanto -C(O)₂R' como -R'C(O)₂-. Como se ha descrito anteriormente, los grupos heteroalquilo, tal y como se usan en la presente memoria, incluyen aquellos grupos que están unidos al resto de la molécula a través de un heteroátomo, tal como -C(O)R', -C(O)NR', -NR'R', -OR', -SR', y/o -SO₂R'. Cuando se indica "heteroalquilo", seguido de indicaciones de grupos heteroalquilo específicos, tales como -NR'R" o semejantes, se entenderá que los términos heteroalquilo y -NR'R" no son redundantes o mutuamente exclusivos. En su lugar, los grupos heteroalquilo específicos se indican para añadir claridad. Así el término "heteroalquilo" no debe interpretarse en la presente memoria como que excluye grupos heteroalquilo específicos, tales como -NR'R" o semejantes. Los grupos heteroalquilo preferidos son grupos heteroalquilo C₁₋₆.

Tal y como se usa en la presente memoria, 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. Los grupos heteroalquileo preferidos son grupos heteroalquileo C₁₋₆.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", en sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a no ser que se afirme otra cosa, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no están limitados a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y semejantes. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no están limitados a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahydrofuran-2-ilo, tetrahydrofuran-3-ilo, tetrahydrofuran-4-ilo, tetrahydrofuran-5-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y semejantes. Un "cicloalquileo" y "heterocicloalquileo" se refieren 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", en sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a no ser que se afirme otra cosa, un átomo de flúor, de cloro, de bromo o de yodo. Además, términos tales como "haloalquilo", se pretende que incluyan monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo(C₁-C₄)" se pretende que incluya, pero no está limitado a, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y semejantes.

45 El término "arilo" significa, a no ser que se afirme otra cosa, un sustituyente hidrocarbonado aromático poliinsaturado que puede ser un único anillo o múltiples anillos (preferiblemente, de 1 a 3 anillos) que están fusionados conjuntamente o unidos covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O, y S, en donde los átomos de nitrógeno y de azufre están opcionalmente oxidados, y el o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un carbono o heteroátomo. Los ejemplos no limitativos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-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 del grupo de sustituyentes aceptables descritos más adelante. "Arileno" y "heteroarileno" se refiere a un radical divalente derivado de un arilo y heteroarilo, respectivamente. Los grupos arilo de la presente invención tienen preferiblemente 5-12 miembros en el anillo, más preferiblemente 6-10 miembros en el anillo. Los grupos heteroarilo de la presente invención tienen preferiblemente 5-12 miembros en el anillo, más preferiblemente 5-10 miembros en el anillo.

Para brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (p. ej., ariloxi, ariltioxi, arilalquilo)

incluye tanto anillos arilo como heteroarilo como se ha definido anteriormente. Así, el término "arilalquilo" se pretende que incluya aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (p. ej., bencilo, fenetilo, piridilmetilo y semejantes) incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (p. ej., un grupo metileno) se ha reemplazado por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (p. ej., fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y semejantes).

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

El término "alquilsulfonilo", tal y como se usa en la presente memoria, 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 especificado de carbonos (p. ej., "alquilsulfonilo C_1-C_4 ").

Cada uno de los términos anteriores (p. ej., "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") se pretende que incluyan tanto las formas sustituidas como no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes ejemplares para cada tipo de radical se proporcionan más adelante.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos que se refieren frecuentemente como alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, y heterocicloalquenilo) pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero no limitados a: $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R'')=NR''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$ en un número que varía de cero a $(2m'+1)$, donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R' , R'' , R''' y R'''' cada uno independientemente preferiblemente se refiere a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido (p. ej., arilo sustituido con 1-3 halógenos), alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son 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, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 4, 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, $-NR'R''$ se pretende que incluya, pero no limitado a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" se pretende que incluya grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (p. ej., $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (p. ej., $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y semejantes).

De manera similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan de, por ejemplo: halógeno, $-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R'')=NR''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ 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 R' , R'' , R''' y R'''' se seleccionan preferiblemente independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo forman opcionalmente un anillo de la fórmula $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$, en 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 de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, en 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 así formado puede reemplazarse opcionalmente con un enlace doble. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la 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 $-S(O)_2NR'-$. Los sustituyentes R , R' , R'' y R''' se seleccionan preferiblemente independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y heteroarilo sustituido o no sustituido.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "heteroátomo" o "heteroátomo del anillo" se pretende que incluya oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P), y silicio (Si).

Un "grupo sustituyente", tal y como se usa en la presente memoria, significa un grupo seleccionado de los siguientes restos:

(A) $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-CN$, $-CF_3$, $-NO_2$, oxo, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no

sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, y

(B) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo, sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de:

5 (i) oxo, -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, y

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

(a) oxo, -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, y

10 (b) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de oxo, -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, y heteroarilo no sustituido.

15 Un "sustituyente con tamaño limitado" o "grupo sustituyente con tamaño limitado", tal y como se usa en la presente memoria, significa un grupo seleccionado de todos los sustituyentes descritos anteriormente para un "grupo sustituyente", en donde cada alquilo sustituido o no sustituido es un alquilo C₁-C₂₀ sustituido o no sustituido, cada heteroalquilo sustituido o no sustituido es un heteroalquilo de 2 a 20 miembros sustituido o no sustituido, cada cicloalquilo sustituido o no sustituido es un cicloalquilo C₄-C₈ sustituido o no sustituido, y cada heterocicloalquilo sustituido o no sustituido es un heterocicloalquilo de 4 a 8 miembros sustituido o no sustituido.

20 Un "sustituyente inferior" o "grupo sustituyente inferior", tal y como se usa en la presente memoria, significa un grupo seleccionado de todos los sustituyentes descritos anteriormente para un "grupo sustituyente", en donde cada alquilo sustituido o no sustituido es un alquilo C₁-C₈ sustituido o no sustituido, cada heteroalquilo sustituido o no sustituido es un heteroalquilo de 2 a 8 miembros sustituido o no sustituido, cada cicloalquilo sustituido o no sustituido es un cicloalquilo C₅-C₇ sustituido o no sustituido, y cada heterocicloalquilo sustituido o no sustituido es un heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido.

25 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se pretende que incluya sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en la presente memoria. Cuando los compuestos de fórmula (II) contienen funcionalidades relativamente ácidas, pueden obtenerse sales de adición a base poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, bien sin disolvente o en un disolvente inerte adecuado.

30 Los ejemplos de sales de adición a base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de fórmula (II) contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición a ácido poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien sin disolvente o en un disolvente inerte adecuado.

35 Los ejemplos de sales de adición a ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o fosforoso y semejantes, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y semejantes. También se incluyen las sales de aminoácidos tales como arginato y semejantes, y las sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y semejantes (véase, por ejemplo, Berge et al, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Determinados compuestos específicos de fórmula (II) contienen tanto funcionalidades básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición bien a base o ácido.

45 Así, los compuestos de fórmula (II) pueden existir como sales con ácidos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de dichas sales incluyen hidroclozuros, hidrobromuros, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartratos (p. ej., (+)-tartratos, (-)-tartratos o mezclas de los mismos incluyendo mezclas racémicas, succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico. Estas sales pueden prepararse por métodos conocidos para los expertos en la técnica.

50 Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferiblemente poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto parental de la manera convencional. La forma parental del compuesto se diferencia de las varias formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares.

55 En la presente memoria también se describen profármacos de los compuestos y son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de fórmula (II). Además, los profármacos pueden convertirse en los compuestos de fórmula (II) por métodos químicos o bioquímicos en un entorno ex vivo. Por ejemplo, los profármacos pueden convertirse lentamente en los compuestos de fórmula (II) cuando se ponen en un reservorio de un parche transdérmico con una enzima o reactivo químico adecuado.

Determinados compuestos de fórmula (II) pueden existir en formas no solvatadas, así como como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y están englobadas en el alcance de la fórmula (II). Determinados compuestos de fórmula (II) pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención.

Determinados compuestos de fórmula (II) poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; los racematos, diastereómeros, tautómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales están englobados en el alcance de la fórmula (II). Los compuestos de fórmula (II) no incluyen aquellos que se sabe en la técnica que son demasiado inestables como para ser sintetizados y/o aislados.

Los compuestos de fórmula (II) también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar 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 fórmula (II), ya sean radiactivas o no, están englobadas en el alcance de la fórmula (II).

Descripción breve de los dibujos

Figura 1. Las nuevas moléculas pequeñas sintéticas incrementan dramáticamente la supervivencia de las hESC después de la disociación en células individuales sin comprometer su autorrenovación a largo plazo y potencial de desarrollo completo, (a) Estructuras químicas de Tiazovivina/Tzv y Pirintegrina/Ptn como se indica- (b) Tinción de ALP de colonias de hESC que se habían crecido a partir de células individuales disociadas sembradas a baja densidad y tratadas como se indica, (c) Relación de colonias positivas para ALP frente a las células totales sembradas inicialmente. (d) Inmunotinción de las hESC mantenidas a largo plazo en medio que contenía Ptn o Tzv como se indica. (e) Secciones de teratomas de 5 semanas formados a partir de hESC expandidas a largo plazo mantenidas en medio que contenía 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 por bandedo G de las hESC después de más de 20 subcultivos, propagadas en presencia de los compuestos Ptn o Tzv. Si no se especifica, todas las hESC anteriores se crecieron en el medio químicamente definido y sin células nutrientes en las placas recubiertas con Matrigel.

Figura 2. Tzv estabiliza las E-cadherinas después de la disociación celular para proteger a las hESC de la muerte en el cultivo en suspensión. (a) Análisis de la muerte celular de hESC disociadas crecidas en Matrigel o en suspensión tratadas con o sin Ptn o Tzv. (b) Imágenes de contraste de fase de hESC crecidas en placas no recubiertas tratadas con las moléculas indicadas. (c) Análisis por transferencia Western de E-cadherinas en las hESC que se transfectoraron con los ARNs específicos frente a E-cadherina o GFP. (d) Análisis de la muerte celular por tinción TUNEL de y (e) Tinción de ALP de hESC disociadas que se transfectoraron con ARNs específicos frente a E-cadherina o GFP en presencia de Tzv. (f) Análisis por transferencia Western de E-cadherinas de longitud completa en hESC antes y después de tripsina. (g) Un análisis por transferencia Western de la evolución temporal de la expresión de E-cadherinas de longitud completa en hESC después de la disociación con tripsina y tratamiento con DMSO, Tzv, o Ptn durante el tiempo indicado. (h) Análisis por citometría de flujo del nivel en la superficie de E-cadherina en hESC después de tratamiento con tripsina en presencia de Tzv. Se usó DMSO como un control. (i) RT-PCR semicuantitativa de E-cadherina en hESC tratadas con o sin Tzv. (j) Análisis de la endocitosis de E-cadherinas en ausencia o presencia de Tzv. (k) Análisis de la supervivencia celular de hESC crecidas en placas recubiertas con BSA o diferentes concentraciones de la quimera E-cad-Fc.

Figura 3. Ptn y Tzv protegen a las hESC de la muerte celular en cultivo adherente después de la disociación manteniendo y reactivando la actividad de las integrinas, (a) Curva de crecimiento de hESC crecidas en Matrigel con diferentes evoluciones temporales de tratamiento con Ptn y Tzv. Grupo 1, tratamiento con Ptn solo durante las primeras 24 h; Grupo 2, tratamiento continuo con Ptn durante el periodo completo de cultivo; Grupo 3, tratamiento con Tzv solo durante las primeras 24 h; Grupo 4, tratamiento continuo con Tzv durante el cultivo; Para cada condición, se sembraron en placas 10×10^4 células disociadas por pocillo de una placa de 6 pocillos. (b) Imágenes de contraste de fase de hESC 12 horas después de la siembra en diferentes matrices y tratadas con los compuestos indicados, (c) Las hESC disociadas se sembraron en placas recubiertas con Matrigel y se dejó que se adhirieran durante 3 h en presencia de compuestos o junto con anticuerpo bloqueante de integrina $\beta 1$ como se indica. El porcentaje de adhesión se calculó como se describe en los Materiales y Métodos. (d) Análisis por transferencia Western de integrina $\beta 1$ expresada por las hESC antes y después del tratamiento con tripsina. (e) Un análisis por transferencia Western de la evolución temporal de la expresión de integrina en las hESC después de disociación con tripsina y tratamiento con DMSO, Tzv, o Ptn durante el tiempo indicado. (f, g) Análisis por citometría de flujo (f), e inmunotinción (g) de las integrinas $\beta 1$ en la conformación activa en las hESC disociadas con tripsina después de tratamiento con Tzv o Ptn. (h, i) Adhesión celular (h) y tinción de ALP (i) de las hESC tratadas con o sin anticuerpo activador de $\beta 1$, TS2/16. (j) Adhesión celular de las 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 en las hESC tratadas con o sin PMA (10 nM). (l, m) Adhesión celular (l) y tinción de ALP (m) de las hESC tratadas con los compuestos indicados.

Figura 4. PI-3 K y ERK mediados por receptores de factores de crecimiento son la señalización principal de

supervivencia y antidiferenciación generados del nicho de las hESC, respectivamente, (a) Análisis de la muerte celular de las hESC disociadas sembradas en Matrigel y tratadas como se indica. (b) Transferencia Western que muestra el estado de fosforilación de diferentes receptores de factores de crecimiento en las hESC tratadas con Ptn durante 2 h. Se usó DMSO como un control, (c) Análisis de la muerte celular de las hESC disociadas en suspensión tratadas con las condiciones indicadas. (d) Inmunoprecipitación que muestra la interacción de las E-cadherinas con EGFR1 y Erb2. (e) Transferencia Western que muestra el estado de fosforilación de AKT en las hESC tratadas con Ptn durante los periodos de tiempo indicados. (f) Transferencia Western que muestra el estado de fosforilación de AKT y ERK en presencia de Ptn o junto con un anticuerpo bloqueante de integrina $\beta 1$. (g) Transferencia Western que muestra el estado de fosforilación de AKT en las hESC tratadas con Ptn o junto con los inhibidores de receptor indicados. (h) Análisis de la muerte celular de las hESC tratadas con Ptn o junto con un inhibidor de PI-3 K, o inhibidor de MEK durante 24 h. (i) Porcentaje de células negativas para SSEA4 después de tratamiento con inhibidor de MEK.

Las Figuras 5A y 5B muestran compuestos de fórmula (II), incluyendo tiazovivina y derivados del mismo.

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 incluyendo pirintegrina y derivados del mismo.

15 Descripción detallada

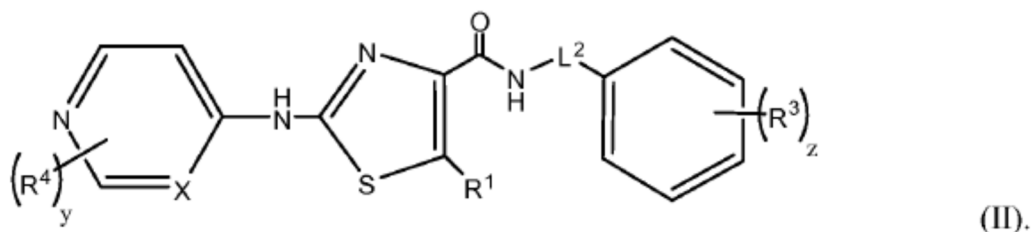
I. Introducción

La presente invención proporciona composiciones y medios de cultivo celular que comprenden nuevos compuestos, así como métodos para el uso de dichos compuestos. Se proporciona una clase de compuestos químicos que son moléculas pequeñas en las composiciones y medios de cultivo celular que previenen la diferenciación de células y promueven la supervivencia celular, incluyendo, pero no limitado a, cuando las células se aíslan o están de otra forma fuera de su medio normal o medio tisular. Los compuestos son útiles como compuestos profilácticos y terapéuticos para varias indicaciones de enfermedad diferentes, incluyendo, pero no limitado a, cáncer, daño tisular, e ictus.

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

En un aspecto, los compuestos presentes en las composiciones y medios de cultivo celular de la invención promueven la supervivencia y/o antidiferenciación celular.

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



En la Formula (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 -CR⁵=. R¹ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido; L² es alquileno C₁-C₆ no sustituido.

R¹ puede ser hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀ no sustituido. En algunas realizaciones, R¹ es simplemente hidrógeno.

R³ es -OR¹⁸, y R¹⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀ sustituido. 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 no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en donde n es un número entero de 0 a 2.

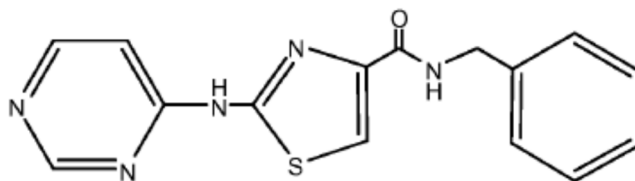
R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷ y R¹⁹ son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido.

En algunas realizaciones, L² es metileno no sustituido.

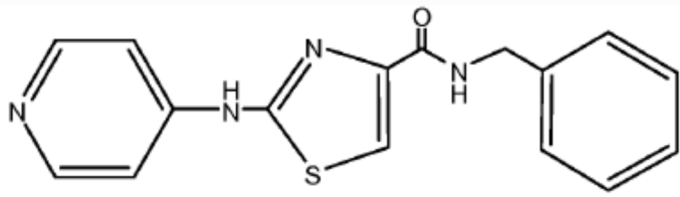
En otras realizaciones, X es -N= o -CH=. El símbolo z puede ser 2. El símbolo z también puede ser 1. El símbolo y puede ser 0 o 1.

En algunas realizaciones, L² es metileno no sustituido, X es -N= o -CH=, R¹ es hidrógeno, e y y z son 0.

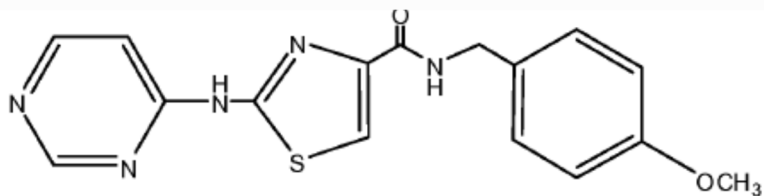
En otras realizaciones, el compuesto tiene la fórmula:



(algunas veces denominado Tiazovivina o "Tzv").



5 o



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) está sustituido con al menos un grupo sustituyente. En otras realizaciones, al menos uno o todos estos grupos están sustituidos con al menos un grupo sustituyente con tamaño limitado. Alternativamente, al menos uno o todos estos grupos están sustituidos con al menos un grupo sustituyente inferior.

En otras realizaciones, en los compuestos de Fórmula (II), cada alquilo sustituido o no sustituido es un alquilo C₁-C₂₀ sustituido o no sustituido, cada heteroalquilo sustituido o no sustituido es un heteroalquilo de 2 a 20 miembros sustituido o no sustituido, cada cicloalquilo sustituido o no sustituido es un cicloalquilo C₃-C₈ sustituido o no sustituido, cada heterocicloalquilo sustituido o no sustituido es un heterocicloalquilo de 3 a 8 miembros sustituido o no sustituido, cada alquileno sustituido o no sustituido es un alquileno C₁-C₂₀ sustituido o no sustituido, y/o cada heteroalquileno sustituido o no sustituido es un heteroalquileno de 2 a 20 miembros sustituido o no sustituido.

En algunas realizaciones, cada grupo alquilo sustituido o no sustituido es un alquilo C₁-C₈ sustituido o no sustituido, cada heteroalquilo sustituido o no sustituido es un heteroalquilo de 2 a 8 miembros sustituido o no sustituido, cada cicloalquilo sustituido o no sustituido es un cicloalquilo C₅-C₇ sustituido o no sustituido, cada heterocicloalquilo sustituido o no sustituido es un heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido, y/o cada alquileno sustituido o no sustituido es un alquileno C₁-C₈ sustituido o no sustituido, y/o cada heteroalquileno sustituido o no sustituido es un heteroalquileno de 2 a 8 miembros sustituido o no sustituido.

En algunas otras realizaciones, los compuestos de fórmula (II) pueden estar sustituidos con alquilo C₁-C₁₀, heteroalquilo C₁-C₁₀, -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, en donde cada R', R'', R''' y R'''' hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, heteroalquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o grupos arilalquilo.

II. Métodos de uso

Los compuestos de fórmula (II) son útiles para una amplia variedad de propósitos. Por ejemplo, los compuestos promueven la supervivencia en situaciones (p. ej., para células aisladas) en las que las células irían de otra forma a apoptosis o morirían de otra forma. En algunas realizaciones, las células se estabilizan durante al menos un periodo de tiempo particular, p. ej., 10 minutos, 30 minutos, o 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, o 96 horas. Además, los compuestos son útiles para mantener el estado actual de diferenciación de las células en condiciones en las que las células se diferenciarían de otra forma o cambiarían su programación de otra forma. Estos efectos dan lugar a un gran número

de usos para los compuestos bien *in vitro* o *in vivo*.

A. Usos *in vivo*

Los compuestos de fórmula (II) son útiles para reducir el daño tisular y así pueden administrarse para tratar, mejorar, prevenir el daño tisular. Un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a un individuo que tiene, o está en riesgo de tener, daño tisular en un órgano interno. Los órganos internos incluyen, pero no están limitados a, cerebro, páncreas, hígado, intestino, pulmón, riñón, o corazón, heridas, p. ej., por quemadura o corte. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (II) pueden ser efectivos para reducir el tamaño de un infarto en reperfusión después de isquemia. Así, un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a individuos en riesgo de tener, que tienen, o han tenido, un ictus. De forma similar, un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a individuos en riesgo de tener, que tienen, o han tenido, un ataque cardíaco o daño cardíaco.

Los inventores han encontrado que los compuestos de fórmula (II) pueden prevenir la muerte celular, por ejemplo, en células epiteliales. Por ejemplo, los inventores dispersaron células de islotes/beta pancreáticas primarias humanas como células individuales en una placa de cultivo tisular que se recubrió con matrigel o laminina. En medio de cultivo celular regular para las células beta sin Tzv, se produjo una muerte celular sustancial. Sin embargo, cuando se añadió Tzv al medio (1-2 mM), la muerte celular se inhibió. Se observó el mismo efecto para otras células primarias epiteliales, tales como células neurales. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a un individuo que necesite células beta y/o de islotes pancreáticos, en donde la administración del compuesto produce un incremento en el número de células beta o de islotes en el individuo.

Además, los compuestos de fórmula (II) son efectivos para incrementar el flujo sanguíneo e inhibir respuestas inflamatorias. Por ejemplo, los compuestos de Fórmula (II) aumentan la adhesión y migración de monocitos a través de monocapas de células endoteliales y pueden aliviar así respuestas inflamatorias (datos no mostrados). Así, un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a un individuo (p. ej., que tiene isquemia cerebral) que necesita un flujo sanguíneo incrementado y/o inflamación disminuida. Aquellos que necesitan inflamación reducida incluyen individuos con una enfermedad inflamatoria o con una enfermedad mediada por una afección inflamatoria. Las enfermedades inflamatorias ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteoartritis, tendinitis o bursitis, artritis gotosa, polimialgia reumática, fibromialgia, enfermedad inflamatoria pélvica y artritis, incluyendo artritis reumatoide,

Los compuestos de fórmula (II) pueden usarse para tratar o mejorar el cáncer. En algunos casos, un compuesto de fórmula (II) puede administrarse para tratar cáncer, p. ej., carcinomas, gliomas, mesoteliomas, melanomas, linfomas, leucemias, adenocarcinomas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, 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 del 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 uretral, cáncer testicular, cáncer de cuello uterino, cáncer vaginal, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer adrenal, cáncer del páncreas endocrino, cáncer carcinoide, cáncer óseo, cáncer de piel, retinoblastomas, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (véase, CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE (DeVita, V. T. et al. eds 1997) para cánceres adicionales).

La metástasis de células cancerosas es típicamente un proceso que implica la transición epitelial a mesenquimal/EMT (p. ej., de células de tipo epitelial a células de tipo fibroblasto). Los inventores han encontrado que los compuestos de fórmula (II) (es decir, Tzv) pueden inducir MET (la inversa de EMT) e inhibir EMT, lo que indica que los compuestos son efectivos para reducir o prevenir las metástasis cancerosas. De acuerdo con esto, un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a un individuo que tiene o está en riesgo de tener metástasis cancerosas. Por ejemplo, los inventores han encontrado que los compuestos de fórmula (II) inhiben las metástasis de cánceres epiteliales incluyendo, pero no limitado a, cáncer de mama y carcinoma hepatocelular.

Un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a un individuo que tiene, o está en riesgo de tener, hipertensión y/o aterosclerosis.

Los compuestos de fórmula (II) (es decir, Tzv) son efectivos para promover la regeneración axonal y la recuperación funcional en un sistema nervioso central dañado. Por ejemplo, los inventores han encontrado que Tzv puede promover el crecimiento de las neuritas a partir de células neuronales primarias de ratones. Se ensayó Tzv (3 μ M) en explantes corticales P1 de ratones, con un resultado de lectura de crecimiento axonal. Se añadió Tzv al medio 20 minutos después de la siembra en placas, con DMSO como un control. Los explantes se observaron durante 4 días en cultivo. Tzv mostró un efecto dramático promoviendo el crecimiento axonal, que fue notable desde la primera división. De acuerdo con esto, un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a un individuo que tiene un daño en el sistema nervioso central o que necesita o se beneficiaría de otra forma de regeneración axonal.

Un compuesto de fórmula (II) puede administrarse a un individuo que tiene diabetes, resistencia a insulina, o que necesita de otra forma promover la supervivencia de las células beta, o está en riesgo de perder la función de las células beta.

Los compuestos de fórmula (II) también encuentran uso para la mejoría de los síntomas negativos de, o mejoría de otra forma, del trasplante de órganos, células, o tejidos. Como se explica en la presente memoria, los compuestos de fórmula (II) son efectivos para estabilizar y mantener la programación contextual de las células. Así, un compuesto de fórmula (II) puede administrarse durante y después del trasplante de células, tejido u órgano a un individuo. Los ejemplos de trasplantes incluyen, pero no están limitados a, trasplante de médula ósea, sangre del cordón umbilical, células madre/progenitoras hematopoyéticas purificadas, células cardíacas, células neurales, células beta pancreáticas, y células hepáticas.

B. Usos in vitro

Los compuestos de fórmula (II) son efectivos para estabilizar células expuestas a una amplia variedad de condiciones. Muchas células animales, cuando se aíslan (en suspensión o alternativamente, cuando son adherentes) pierden viabilidad, pasan a través de apoptosis, y/o cambian la programación (por ejemplo, las células madre cuando se aíslan, frecuentemente morirán o se diferenciarán). Los compuestos de fórmula (II), cuando se mezclan con dichas células, son efectivos para prevenir dichas respuestas celulares a cambios en el entorno. En algunas realizaciones, las células se aíslan de un animal y se ponen en contacto con un compuesto de fórmula (II) en una cantidad suficiente como para prevenir la pérdida de la viabilidad celular y/o cambios en la programación celular. En algunas realizaciones, dichas células aisladas son útiles para diagnóstico ya que las células aisladas retienen fenotipos que de otra manera se perderían debido a la respuesta de la célula al proceso de aislamiento y al aislamiento en sí mismo. Los fenotipos retenidos ejemplares pueden incluir, por ejemplo, patrones de expresión génica, capacidad de respuesta de la célula a un estímulo, ligando, o fármaco, viabilidad celular.

La estabilidad de una población de células puede monitorizarse, por ejemplo, monitorizando la expresión de productos génicos. Por ejemplo, determinados productos génicos son específicos de tejido o tipo de célula y pueden monitorizarse antes y después de un cambio en la condición o entorno (por ejemplo, cambio del medio celular, descongelación de la célula, aislamiento de la célula 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 o entorno, o relativamente poco después (p. ej., en 1 minuto, 5 minutos, una hora, etc., dependiendo de las circunstancias) del cambio, se ponen en contacto con un compuesto de fórmula (II) en una cantidad suficiente de manera que uno o más marcadores de la expresión celular permanecen sustancialmente igual. "Sustancialmente igual" dependerá del contexto y se entenderá en la técnica. En algunas realizaciones, "sustancialmente igual" significa que la expresión de un producto génico asociado con un tipo celular específico no cambia más de aproximadamente el 10 %, 20 % o 30 % después de un tratamiento particular a la célula (p. ej., comparado con la expresión antes del tratamiento).

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para promover la supervivencia y antidiferenciación en células madre ex vivo. Por ejemplo, los inventores han encontrado que los compuestos de Fórmula (II) (es decir, Tzv) son efectivos para promover la supervivencia y antidiferenciación en células madre embrionarias humanas, células madre embrionarias de ratón, múltiples células madre neurales, células madre de la piel, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre estromales y células madre epiteliales poniendo en contacto las células con un compuesto de Fórmula (II) inmediatamente después del aislamiento de las células.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona una composición que comprende poblaciones de células aisladas que comprenden células madre, células progenitoras o células diferenciadas de las mismas, y una cantidad suficiente de un compuesto de Fórmula (II) para estabilizar las células, p. ej., para prevenir o reducir respuestas celulares a cambios en condiciones (p. ej., aislamiento de un tejido, descongelación de las células, etc.). En algunas realizaciones, por ejemplo, las células en contacto con un compuesto de fórmula (II) están en estados congelado o líquido. En algunas realizaciones, las células se descongelan de un estado congelado mientras están en contacto con una cantidad suficiente de un compuesto de fórmula (II) para prevenir o reducir el daño o diferenciación celular.

En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula (II) se pone en contacto con una población de células madre, células progenitoras o células diferenciadas. Las células madre ejemplares incluyen células madre pluripotentes, células madre embrionarias, células madre inducidas (células iPS). Las células madre ejemplares también incluyen células madre embrionarias humanas, células madre embrionarias de ratón, múltiples células madre neurales, células madre de la piel, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre estromales, y células madre epiteliales. Cualquier tipo de células progenitoras puede usarse, incluyendo, pero no limitado a, células progenitoras del endodermo, células progenitoras del mesodermo (p. ej., células progenitoras del músculo, células progenitoras del hueso, células progenitoras de la sangre), y células progenitoras del ectodermo (p. ej., células progenitoras del tejido epidérmico y células progenitoras neurales). Hay una amplia variedad de células diferenciadas conocidas. Las células diferenciadas incluyen, pero no están limitadas a, fibroblastos, células cardíacas, células neurales, células beta pancreáticas, células hepáticas, células epiteliales, y células intestinales. Las células descritas en la presente memoria 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 de primate no humano.

La capacidad de mantener la viabilidad celular y programación celular permite métodos mejorados de cribado de fármacos y diagnóstico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula se criba para detectar una respuesta en presencia de al menos un compuesto de fórmula (II), manteniendo de esta manera la viabilidad de la célula, y se pone

- además en contacto con al menos uno de una pluralidad de agentes (p. ej., una biblioteca química) y se monitoriza entonces para detectar una respuesta. Se conoce un amplio rango de métodos de cribado. Este método encuentra un beneficio particular para el uso con células que de otra forma tendrían una baja viabilidad en las condiciones del método de cribado (por ejemplo, cuando es conveniente usar células aisladas, células en suspensión, células adhesivas, etc.). Las células pueden ser, por ejemplo, células madre, células progenitoras o células diferenciadas, como se describe en la presente memoria. La respuesta celular puede ser cualquier respuesta deseada. Algunas respuestas en ensayos de cribado basados en células incluyen, pero no están limitadas a, expresión de un gen (p. ej., sobre la base de la expresión de un gen informador o cuantificado 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 cribado pueden ser, por ejemplo, compuestos orgánicos pequeños (p. ej., con un peso molecular menor de 10 000 daltons, por ejemplo, menor de 8000, 6000, 4000, 2000 daltons), lípidos, azúcares, polipéptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos (p. ej., oligonucleótidos, ADN, ARN, ribozimas, ARN inhibidor corto (ARNsi), micro ARN (ARNmi), etc.).
- En algunas realizaciones, los ensayos se diseñan para cribar bibliotecas combinatorias grandes mediante la automatización de las etapas del ensayo y proporcionando compuestos de cualquier fuente conveniente a los ensayos, que se operan típicamente en paralelo (p. ej., en formatos de microtitulación o en placas de micropocillos en ensayos robóticos). Las bibliotecas combinatorias pueden ser completamente aleatorias, o comprender miembros que contienen una estructura central basada en uno o más compuestos líder prometedores. Las bibliotecas combinatorias pueden ser completamente sintéticas o pueden incluir algunos o todos los miembros que derivan de fuentes naturales, incluyendo, por ejemplo, bacterias, hongos, plantas, insectos y vertebrados (p. ej., *Xenopus* (rana) o *Anguilla* (anguila)) y animales no vertebrados (p. ej., *Strongylocentrotus* (erizo de mar) o moluscos). Véase, también, Boldi, *Combinatorial Synthesis of Natural Product Based Libraries*, 2006, CRC Press.
- En una realización, los métodos de cribado de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca combinatoria química o de péptidos que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos potenciales moduladores o ligandos). Dichas "bibliotecas combinatorias químicas" o "bibliotecas de ligandos" se criban entonces en uno o más ensayos, como se describe en la presente memoria, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos líder" convencionales o pueden usarse en sí mismos como terapéuticos potenciales o reales.
- Una biblioteca combinatoria química es una colección de diversos compuestos químicos generada bien por síntesis química o síntesis biológica, combinando un número de "bloques de construcción" químicos, tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca combinatoria química lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando un conjunto de bloques de construcción químicos (aminoácidos) de todas las maneras posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipéptido). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos mediante dicho mezclado combinatorio de bloques de construcción químicos.
- La preparación y cribado de bibliotecas combinatorias químicas es muy conocido para los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5 663 046; 5 958 792; 6 185 506; 6 541 211; 6 721 665. Dichas bibliotecas combinatorias químicas incluyen, pero no están limitadas a, bibliotecas de péptidos (véase, p. ej., Pat. U.S. No. 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. También pueden usarse otras químicas para generar bibliotecas con diversidad química. Dichas químicas incluyen, pero no están limitadas a: peptoides (p. ej., Publicación PCT No. WO 91/19735), péptidos codificados (p. ej., Publicación PCT WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (p. ej., Publicación PCT No. WO 92/00091), benzodiazepinas (p. ej., Pat. U.S. No. 5 288 514), diversómeros, tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al, *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílicos (Hagihara et al, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con soporte de glucosa (Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánica análoga 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 Villalgorido, *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 fosfonatos de peptidilo (Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, Ausubel, *infra*, Sambrook y Russell, *infra* y Patentes U.S. Nos. 6 955 879; 6 841 347; 6 830 890; 6 828 098; 6 573 098; y 6 399 334), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véanse p. ej., las Pat. U.S. Nos. 5 539 083; 5 864 010 y 6 756 199), bibliotecas de anticuerpos (véase, p. ej., Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) y PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, p. ej., Liang et al., *Science*, 274:1520-1522 (1996); Pat. U.S. No. 5 593 853; y *Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries*, Seeberger, ed., 2004, John Wiley & Sons (E-book)), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, p. ej., benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993) y Pat. U.S. No. 5 288 514; isoprenoides, Pat. U.S. No. 5 569 588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Pat. U.S. No. 5 549 974; pirrolidinas, Pat. U.S. Nos. 5 525 735 y 5 519 134; compuestos morfolino, Pat. U.S. No. 5 506 337, y semejantes). Véase también, *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 comercialmente (véase, p. ej., Advanced Chem Tech, Louisville KY., Symphony, Rainin, Woburn, MA., Applied Biosystems, Foster City, CA., Millipore, Bedford, MA y Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA).

- 5 En algunas realizaciones, los ensayos de cribado pueden llevarse a cabo convenientemente en placas con múltiples pocillos (p. ej., 96 pocillos, 384 pocillos, etc.), en donde cada agente que se va a cribar se ensaya individualmente en un único pocillo. En algunas realizaciones, dos o más agentes candidatos se ensayan en una única mezcla reacción

C. Dianas alternativas para obtener efectos similares

- 10 Como se describe con detalle en los ejemplos siguientes, los inventores han aprendido acerca del papel de varios productos génicos en la respuesta celular a los compuestos de fórmula (II) y esto ha dado lugar al descubrimiento de que las células también pueden estabilizarse mediante la manipulación de los productos génicos como se explica más adelante.

1. E-cadherina

- 15 Los inventores han encontrado que el incremento de la expresión de la E-cadherina aumenta la supervivencia de las células madre. Así, la presente invención proporciona métodos para estabilizar y/o incrementar la expresión de E-cadherina en una célula, estabilizando de esta manera a la células frente a un cambio de condiciones que de otra forma sería perjudicial para la viabilidad de la célula. La estabilización con E-cadherina puede incluir, por ejemplo, poner en contacto las células con un compuesto que incrementa la expresión de E-cadherina o protege de alguna manera a la E-cadherina frente a la escisión proteolítica.

- 20 En la presente memoria se describen métodos para cultivar células madre (incluyendo, pero no limitado a, células madre embrionarias humanas o de ratón) en un contenedor que tiene una superficie recubierta con una proteína que comprende al menos un ectodominio de E-cadherina, unido opcionalmente a otro componente tal como una proteína de fusión, estabilizando de esta manera las células (p. ej., manteniendo o incrementando 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 la célula). En algunas realizaciones, los ectodominios son la parte de una proteína que inician el contacto con la superficie que da lugar a la transducción de la señal. El ectodominio de la E-cadherina se describe, p. ej., en Ito et al, Oncogene 18(50):7080-90 (1999) Al menos el ectodominio de la E-cadherina puede fusionarse con una secuencia de polipéptido de dimerización, permitiendo de esta manera la formación de dímeros estabilizados del ectodominio. Un "polipéptido de dimerización" se refiere a una secuencia de aminoácidos que forma homodímeros, permitiendo de esa manera que dos polipéptidos dimericen. Los polipéptidos de dimerización ejemplares incluyen, pero no están limitados a, un fragmento Fc de IgG. Las células madre (incluyendo, pero no limitado a, células madre embrionarias humanas o de ratón, células madre pluripotentes, células iPS) pueden disociarse una de otra y cultivarse en un contenedor que tiene una superficie recubierta con una proteína que comprende al menos un ectodominio de E-cadherina, unido opcionalmente a otro componente tal como una proteína de fusión, estabilizando de esta manera las células y mejorando la tasa de supervivencia de las células comparado con la tasa de supervivencia de células tratadas de forma similar cultivadas en un contenedor que carece del recubrimiento con el polipéptido.

2. Proteína quinasa C

- 40 En la presente memoria también se describen métodos para estabilizar células poniendo en contacto las células con un activador de la proteína quinasa C. Como se explica en la presente memoria, el tratamiento de hESC disociadas con un activador de la proteína quinasa C crecidas en presencia de una matriz de matrigel produjo una adhesión celular y formación de colonias significativamente mejoradas, mejorando de esta manera la viabilidad celular. De acuerdo con esto, la viabilidad celular puede mejorarse cultivando las células en presencia de un activador de la proteína quinasa C, mejorando de esta manera la viabilidad, crecimiento y/o adhesión de las células. Un activador de la proteína quinasa C puede ponerse en contacto con una población de células madre, células progenitoras o células diferenciadas en una cantidad suficiente como para mejorar la viabilidad y/o supervivencia y/o adhesión de las células. Las células madre ejemplares incluyen células madre pluripotentes, células madre embrionarias, células madre inducidas (células iPS) o como se describe de otra forma en la presente memoria. Los activadores de la proteína quinasa C ejemplares incluyen, pero no están limitados a, ésteres de forbol (p. ej., 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) o ésteres de forbol como se describe en la Publicación de Patente US No. 20080226589) o agonistas peptídicos (p. ej., como se describe en la Patente US No. 6 165 977).

3. Integrina $\beta 1$

- 55 En la presente memoria también se describen métodos para estabilizar células poniendo en contacto las células con un activador de la integrina $\beta 1$. Como se explica en la presente memoria, el tratamiento de hESC disociadas con un activador de la integrina $\beta 1$, cuando las células se crecen en lámina produjo una adhesión celular y formación de colonias significativamente mejoradas, mejorando de esta manera la viabilidad celular. De acuerdo con esto, la viabilidad celular puede mejorarse cultivando las células en presencia de un activador de la integrina $\beta 1$, mejorando

de esta manera la viabilidad, crecimiento y/o adhesión de las células. Un activador de la integrina $\beta 1$ puede ponerse en contacto con una población de células madre, células progenitoras o células diferenciadas en una cantidad suficiente como para mejorar la viabilidad y/o supervivencia y/o adhesión de las células. Las células madre ejemplares incluyen células madre pluripotentes, células madre embrionarias, células madre inducidas (células iPS) o como se describe de otra forma en la presente memoria. Los activadores de la integrina $\beta 1$ ejemplares incluyen, pero no están limitados a, un anticuerpo activador de la integrina $\beta 1$ tal como, p. ej., TS2/16 (disponible comercialmente en, p. ej., Thermo Scientific, Rockfield, Ill.).

IV. Poblaciones celulares

Como se discute en la presente memoria, la presente invención proporciona células en una mezcla (p. ej., un cultivo celular) con uno o más compuestos de fórmula (II) - incluyendo, pero no limitado a, Tzv. En algunas realizaciones, el compuesto está en la mezcla a una concentración suficiente como para mantener la viabilidad o la programación celular en respuesta a un cambio del entorno o condición celular (p. ej., descongelación). Por ejemplo, en algunas realizaciones, los compuestos están en una concentración de al menos 0.1 nM, p. ej., al menos 1, 10, 100, 1000, 10 000, o 100 000 nM, p. ej., entre 0.1 nM y 100 000 nM, p. ej., entre 1 nM y 10 000 nM, p. ej., entre 10 nM y 10 000 nM, p. ej., entre 1-10 μ M. En algunas realizaciones, las mezclas están en un recipiente sintético (p. ej., un tubo de ensayo, una placa Petri, etc.). Las células son células aisladas (no son parte de un animal). En algunas realizaciones, las células son células adherentes o células en suspensión. En algunas realizaciones, las células se aíslan o disocian de una muestra de tejido (p. ej., una biopsia) de un animal (humano o no humano), se ponen en un recipiente, y se ponen en contacto con uno o más compuestos de fórmula (II). Las células pueden cultivarse posteriormente y, opcionalmente, insertarse de nuevo en el mismo animal o uno diferente, opcionalmente después de que las células se hayan estimulado para diferenciarse en un tipo o linaje celular particular, o después de la introducción de un casete de expresión recombinante en las células.

V. Cultivo de las células

Las células pueden cultivarse según cualquier método conocido en la técnica. Las células pueden cultivarse en suspensión o como células adherentes, según sea apropiado.

En algunas realizaciones, las células (p. ej., células madre) se cultivan en contacto con células nutrientes. Las células nutrientes ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, células fibroblastos, p. ej., células fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Los métodos para cultivar células en células nutrientes son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, las células se cultivan en ausencia de células nutrientes. Las células, por ejemplo, pueden unirse directamente a una superficie de cultivo sólida (p. ej., una placa de cultivo), p. ej., a través de un anclaje molecular. Los anclajes moleculares ejemplares incluyen, pero no están limitados a, matrigel, una matriz extracelular (ECM), análogos de ECM, laminina, fibronectina, o colágeno. Los expertos en la técnica reconocerán, sin embargo, que esta es una lista no limitativa y que pueden usarse otras moléculas para unir células a una superficie sólida. Los métodos para la unión inicial de los anclajes a la superficie sólida son conocidos en la técnica.

VI. Formulaciones y métodos de administración

En la presente memoria se describen formulaciones que comprenden un compuesto de fórmula (II), que son adecuadas para administración, que incluyen disoluciones acuosas y no acuosas, disoluciones isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. Las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, oralmente, nasalmente, tópicamente, intravenosamente, intraperitonealmente, o intratecalmente. Las formulaciones de los compuestos pueden presentarse en contenedores sellados de dosis unitaria o múltiples dosis, tales como ampollas y viales. Las disoluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos, gránulos, y comprimidos estériles de la clase descrita previamente. Los moduladores también pueden administrarse como parte de un alimento o fármaco preparado.

La dosis administrada a un paciente debería ser suficiente como para inducir una respuesta beneficiosa en el sujeto con el tiempo. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores incluyendo la eficacia del modulador específico empleado, la edad, peso corporal, actividad física, y dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad de la enfermedad o afección en cuestión. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza, y grado de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan a la administración de un compuesto o vector particular en un sujeto particular

En la determinación de la cantidad efectiva de un ingrediente activo que se va a administrar, un médico puede evaluar los niveles plasmáticos circulantes del compuesto o agente, toxicidad del compuesto o agente, y la producción de anticuerpos anticompuesto 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 típico.

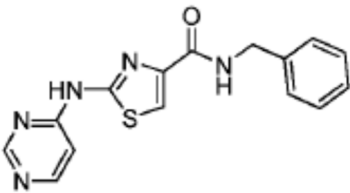
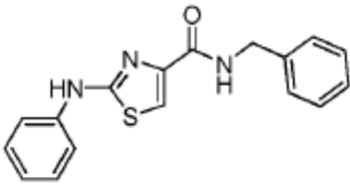
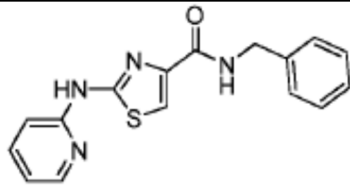
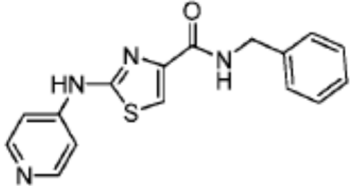
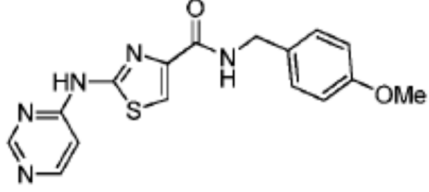
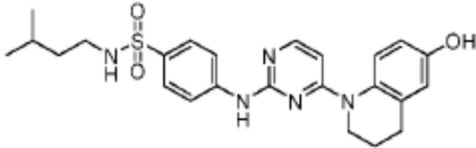
VII. Ejemplos

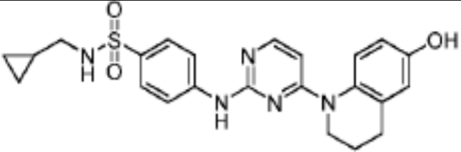
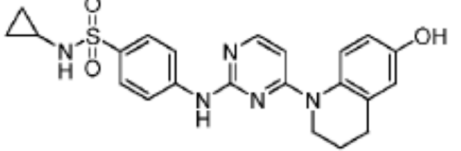
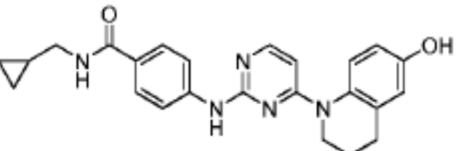
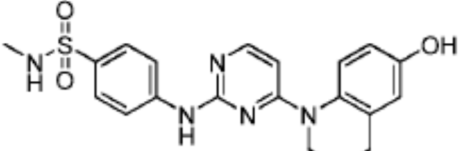
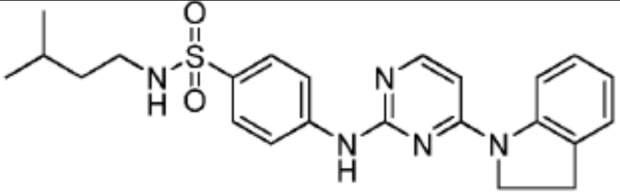
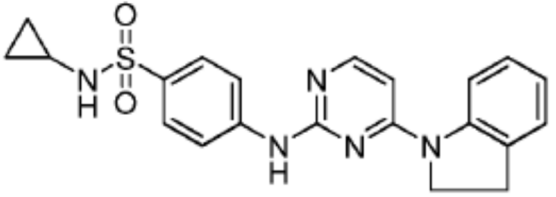
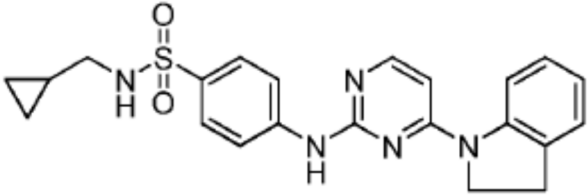
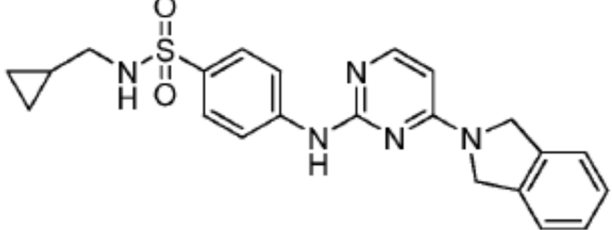
Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

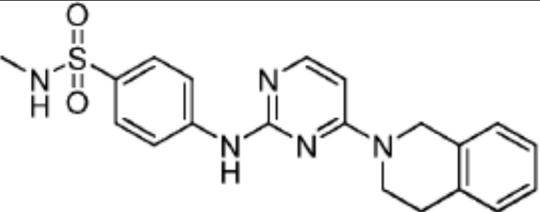
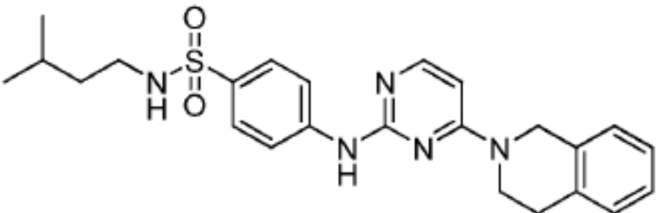
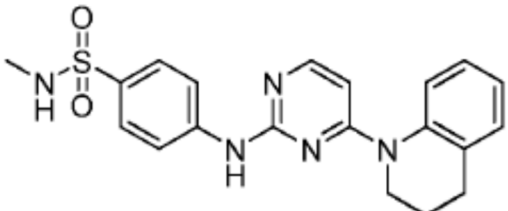
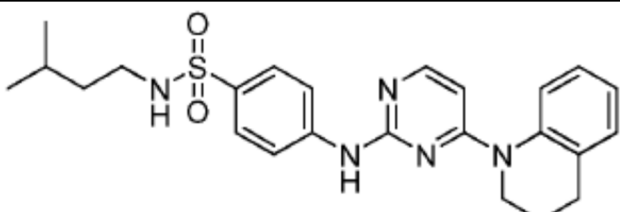
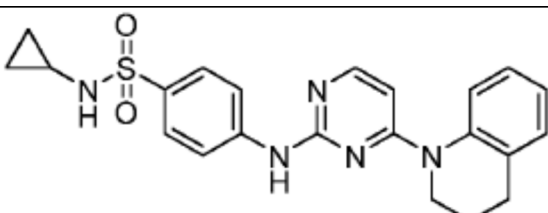
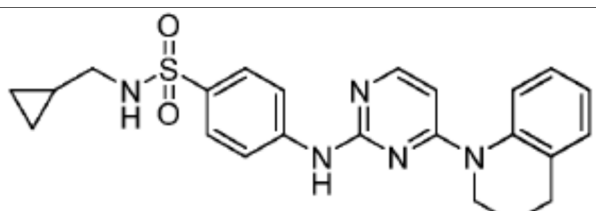
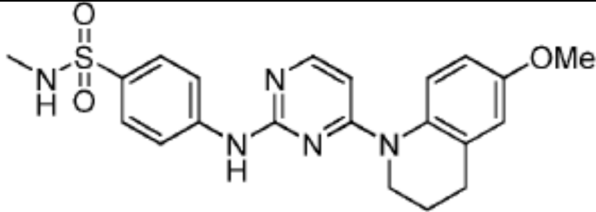
Ejemplo 1:

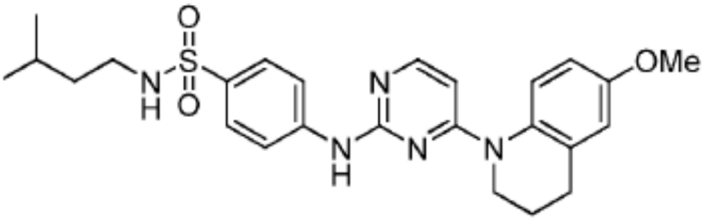
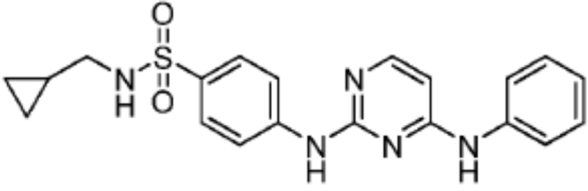
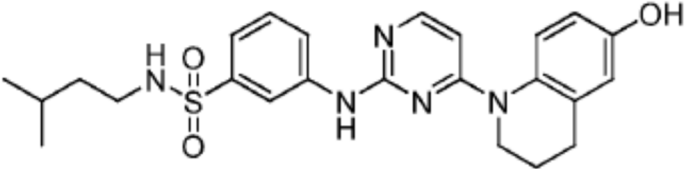
5 Para mejorar las condiciones del medio químicamente definido y descubrir el mecanismo molecular de la muerte de las hESC después de la disociación en células individuales, realizamos un cribado fenotípico de alto rendimiento de 50 000 compuestos sintéticos para identificar moléculas pequeñas que promueven la supervivencia de las hESC después de la disociación con tripsina. A partir del cribado, se identificaron dos clases químicas que incrementaron significativamente la supervivencia celular después de la disociación y también mantuvieron la morfología de las colonias de las hESC y la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP). Las optimizaciones químicas y análisis de actividad adicionales dieron lugar al descubrimiento de dos moléculas líder, un tiazol disustituido en 2,4 (denominado Tiazovivina/Tzv) y una pirimidina disustituida en 2,4 (denominada Pirintegina/Ptn) (Fig. 1a), para caracterizaciones funcionales y mecánicas adicionales

Tabla 1. Datos de actividad

Compuesto	Actividad (% de formación de colonias positivas para ALP por las hESC) ¹
	24.1
	4.5
	5.2
	20.3
	5
	23.5

Compuesto	Actividad (% de formación de colonias positivas para ALP por las hESC) ¹
	23.2
	8
	2.9
	5.7
	3.1
	6.2
	6.1
	3.5

Compuesto	Actividad (% de formación de colonias positivas para ALP por las hESC) ¹
	3.6
	3.2
	3
	3.4
	3.1
	5.2
	3.1

Compuesto	Actividad (% de formación de colonias positivas para ALP por las hESC) ¹
	3.3
	3.3
	3.1
¹ Relación de colonias positivas para ALP frente a las células totales sembradas inicialmente	

El compuesto Tzv o Ptn aumenta la supervivencia de hESC individuales más de 20 veces en placas recubiertas con Matrigel después de la disociación enzimática (Fig. 1b, c). Las hESC se habían subcultivado de forma seriada en medio químicamente definido que contenía Tzv o Ptn durante más de 20 generaciones. En dichas condiciones, las células mantuvieron de forma homogénea la morfología característica de las hESC, la expresión de marcadores pluripotenciales típicos, y un cariotipo normal (Fig. 1d, e). Cuando estas células se inyectaron en ratones desnudos, generaron teratomas complejos que consistían en los tres tejidos de la capa germinal primarios (Fig. 1f). Estos resultados, confirmados con varias líneas de hESC independientes, demostraron de forma colectiva y convincente que ambos compuestos podrían promover sustancialmente la supervivencia de las hESC sin comprometer la autorrenovación y la potencia de desarrollo completa.

Se sabe que es difícil que las hESC formen cuerpos embrioides (EB) en cultivo en suspensión después de la disociación en células individuales debido a una muerte celular extensa. Así, también ensayamos si Tzv o Ptn podían promover la supervivencia de las hESC disociadas en suspensión. De forma interesante, Tzv mejoró en gran medida la supervivencia de las hESC tanto en cultivos adherentes como en suspensión. Por el contrario, Ptn solo promovió la supervivencia de las hESC en cultivo adherente (p. ej., en placas recubiertas con Matrigel), pero no tuvo efecto en el cultivo en suspensión (Fig. 2a). Estas observaciones sugieren que al menos dos mecanismos distintos están implicados 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 formaron buenos agregados celulares cuando se crecieron en suspensión y en presencia de Tzv (Fig. 2b), y pudieron diferenciarse en varios linajes (datos no mostrados). Como la agregación celular está mediada lo más frecuentemente a través de adhesiones célula-célula y la E-cadherina es la molécula de adhesión célula-célula principal, y también está altamente expresada en hESC (Eastham, A.M. et al., Cancer Res 67 (23): 11254-11262 (2007)), ensayamos el efecto de un anticuerpo bloqueante de E-cadherina específico sobre la formación de agregados multicelulares. Cuando las células se cultivaron en presencia del anticuerpo, la supervivencia celular y la formación de agregados grandes compactos inducida por el tratamiento con Tzv se inhibió en gran medida, indicando que la supervivencia celular y el ensamblaje de los agregados multicelulares inducido por Tzv implica a la E-cadherina funcional (Fig. 2b). Además, la inactivación de la E-cadherina por ARNsi específicos en hESC redujo dramáticamente la supervivencia celular inducida por el tratamiento con Tzv, y disminuyó significativamente el número de colonias positivas para ALP (Fig. 2c,d,e). Estos resultados sugieren que Tzv aumenta la supervivencia de las hESC en suspensión, presumiblemente actuando a través de la adhesión célula-célula mediada por la E-cadherina.

Examinamos entonces la expresión de la E-cadherina en hESC después de la disociación con tripsina. Encontramos que la mayor parte de la E-cadherina de longitud completa se había escindido después de la disociación con tripsina (Fig. 2f). Esta observación fue consistente con el reporte de que la región extracelular de la E-cadherina tiene un sitio de escisión endoproteolítico cerca del dominio transmembrana (Damsky, CH. et al., Cell 34 (2):455-466 (1983)). En células no tratadas con Tzv, apareció E-cadherina de longitud completa sintetizada *de novo* 1h después del tratamiento enzimático y desapareció después de 4 h, sugiriendo que las E-cadherinas sintetizadas *de novo* en las hESC

disociadas no eran estables. Sin embargo, en las células tratadas con Tzv, la expresión de E-cadherinas se incrementó significativamente (Fig. 2g). Además, el análisis por citometría de flujo reveló que las E-cadherinas de la superficie celular en las hESC se incrementaron significativamente por Tzv (Fig. 2h). Por lo tanto, es probable que Tzv afecte la adhesión celular modulando el nivel en la superficie celular de E-cadherinas. La RT-PCR semicuantitativa reveló cantidades comparables de transcritos de E-cadherina en controles simulados y células tratadas con Tzv (Fig. 2i), sugiriendo que la diferencia en los niveles de proteína E-cadherina no era debida a niveles alterados de la transcripción. Es probable que Tzv ejerza su efecto a través de la estabilización de la E-cadherina en la superficie celular. Finalmente, el ensayo de endocitosis reveló que la internalización de las E-cadherinas se bloqueó significativamente por Tzv. Estos resultados indican que Tzv regula las actividades de las E-cadherinas a través de la inhibición de la endocitosis de las E-cadherinas (Fig. 2j).

La disociación célula-célula por la tripsina da lugar a una escisión rápida y desestabilización posterior de las E-cadherinas. Establecimos la hipótesis de que la estabilidad de las E-cadherinas también podría estar mediada por su interacción homofílica entre las células. Así, la ligación homofílica de las E-cadherinas con ligandos recombinantes puede estabilizar a las E-cadherinas y afectar la supervivencia de las hESC. Para ensayar esta hipótesis, recubrimos placas con una proteína quimera dimérica de E-cadherina-Fc que contenía el ectodominio de la E-cadherina fusionado con el fragmento Fc de IgG (Ecad-Fc). De forma notable, las hESC disociadas unidas a la superficie recubierta y su tasa de supervivencia se incrementaron significativamente de una manera dependiente de la dosis (Fig. 2k), confirmando que la adhesión célula-célula mediada por las E-cadherinas es un regulador importante para la supervivencia de las hESC.

Tanto Tzv como Ptn tienen un efecto dramático en la supervivencia de las hESC crecidas en placas recubiertas con Matrigel. Parece improbable que dicho efecto promotor de la supervivencia se deba a la influencia sobre el crecimiento celular y puede atribuirse en gran medida al incremento en la capacidad de adhesión celular después de los procesos de disociación celular y siembra (Fig. 3a,b). De hecho, las hESC disociadas que se trataron con Tzv o Ptn presentaron una adhesión dramáticamente incrementada a Matrigel o laminina. Por el contrario, la adhesión de las hESC a gelatina o polilisina (Fig. 3b y datos no mostrados), que no implica a las integrinas, no se vio afectada por el tratamiento con Ptn o Tzv. El componente principal de Matrigel es laminina, y se ha reportado que el receptor de la laminina integrina $\beta 1$ está altamente expresado en hESC (Xu, C. et al, Nat Biotechnol 19 (10):971-974 (2001)). Para ensayar si Ptn o Tzv actúa a través de la integrina $\beta 1$, pretratamos las células con un anticuerpo bloqueante frente a la integrina $\beta 1$, y observamos que la unión celular incrementada inducida por el tratamiento con el compuesto se suprimió completamente. Esto sugiere que Tzv y Ptn median la adhesión celular a sustratos ECM a través de la integrina $\beta 1$ (Fig. 3c).

Para obtener información acerca del mecanismo de la regulación de la integrina $\beta 1$ por Tzv y Ptn, investigamos si el efecto de los compuestos se debe a cambios en la expresión de la integrina. A diferencia de la E-cadherina, la integrina $\beta 1$ no se escindió por tripsina. Los análisis por transferencia Western revelaron que es improbable que el efecto de los compuestos se deba a expresiones incrementadas de la integrina $\beta 1$. Así, es probable que Tzv y Ptn afecten la adhesión celular modulando la actividad de la integrina (Fig. 3 d,e). Para examinar los efectos del tratamiento con los compuestos sobre la actividad de la integrina $\beta 1$, usamos 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)). Notablemente, el tratamiento con los compuestos incrementó el nivel de unión de HUTS-21 (Fig. 3f,g). Estos resultados sugieren de forma colectiva que Tzv y Ptn incrementan la adhesión celular por la modulación de dentro a afuera de la actividad de la integrina.

Si ambos compuestos químicos aumentaban la adhesión celular convirtiendo las integrinas en una conformación activa, el tratamiento de las células con el anticuerpo que activa las integrinas, que bloquea a las integrinas en una conformación activa, debería tener un efecto similar al de los compuestos. De hecho, cuando se sembraron en placas hESC disociadas en laminina en presencia de TS2/16, un anticuerpo activador de la integrina $\beta 1$ (van de Wiel-van Kemenade, E. et al, J Cell Biol 117 (2):461-470 (1992)), la adhesión celular se incrementó significativamente y las células formaron un número incrementado de colonias comparado con el control (Fig. 3h,i). Estos resultados sugieren que la adhesión incrementada, que se produce cuando las células se tratan con estos compuestos, implica un mecanismo que induce la activación de la integrina.

Para diseccionar adicionalmente el mecanismo molecular por el que Tzv y Ptn regulan la actividad de la integrina, examinamos los efectos de varios inhibidores de la ruta. Encontramos que bisindolilmaleimida I, un inhibidor específico de PKC, podía antagonizar la adhesión celular incrementada inducida por Ptn, pero no tenía efecto en la adhesión celular inducida por Tzv. Esto sugiere que la PKC puede mediar la acción de Ptn pero no de Tzv (Fig. 3j). Para confirmar adicionalmente el papel de la PKC en la supervivencia de las hESC, se trataron hESC disociadas con el agonista de la PKC 12-miristato 13 -acetato de forbol (PMA). El tratamiento con PMA causó la activación de la integrina, así como un incremento sustancial en la adhesión celular y la formación de colonias (Fig. 3k,l,m).

El destino de las células madre está influido por su nicho celular, que consiste en factores de crecimiento, interacción célula-ECM, e interacción célula-célula. El hecho de que la supervivencia de las hESC sea altamente dependiente de la interacción célula-célula y/o interacción células-ECM, reveló la importancia de dicho nicho *in vitro* previamente no reconocido para las hESC. De forma más importante, las expresiones de proteínas intrínsecas de las células (p. ej., E-cadherinas e integrinas) y mecanismos reguladores (p. ej., estabilización y activación de proteínas), no solo

responden a, pero también son, componentes esenciales del nicho, lo que sugiere que las células madre poseen la capacidad intrínseca de construir su propio nicho en ausencia de otros factores extrínsecos o tipos celulares, que, sin embargo, participan y aumentan el mecanismo de las células del nicho autorregulador.

5 La interacción entre el entorno físico/estructural y el factor de crecimiento juega un papel muy importante en la regulación del destino de las células (Comoglio, P.M., Boccaccio, C, y Trusolino, L., *Curr Opin Cell Biol* 15 (5):565-571 (2003)). Para examinar si los factores de crecimiento están implicados en la supervivencia de las hESC mediada por integrinas, tratamos hESC disociadas con Tzv o Ptn junto con inhibidores de receptores de factores de crecimiento individuales altamente específicos. Encontramos que la inhibición química de FGFR, IGFR, EGFR1 o Erb2 disminuyó en gran medida el efecto promotor de la supervivencia inducido por el tratamiento con Tzv o Ptn (Fig. 4a). Además, Ptn incrementó significativamente la fosforilación del receptor del factor de crecimiento, sugiriendo que la unión de los receptores de factores de crecimiento se requiere para la supervivencia celular mediada por integrinas (Fig. 4b). De forma similar, la inhibición de FGFR, IGFR, EGFR1 o Erb2 también suprimió en gran medida la supervivencia de las hESC inducida por Tzv en cultivo en suspensión. Además, Tzv indujo la unión de E-cadherinas a EGFR1 y ERB2, indicando el papel importante de los receptores de factores de crecimiento en la supervivencia celular mediada por E-cadherina (Fig. 4c, d).

10 La señalización a través de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3K) y MAPK/ERK son reguladores principales para la autorrenovación de las 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 efector aguas abajo de PI-3K, se incrementaron después del tratamiento de hESC disociadas con Ptn, y este incremento se suprimió con el anticuerpo bloqueante de integrinas (Fig. 4e,f). Además, la activación de AKT y ERK por Ptn se bloqueó por inhibidores de FGFR, IGFR, EGFR o Erb2 (Fig. 4g y datos no mostrados). La inhibición química de la acción de PI-3K antagonizó significativamente el efecto sobre la supervivencia inducido por Ptn (Fig. 4h). La inhibición de ERK no tuvo un efecto dramático sobre la supervivencia inducida por Ptn, pero indujo la diferenciación de las hESC (Fig. 4i). Estos resultados demostraron que la activación de la PI-3K es una señalización para la supervivencia importante y que la activación de ERK es una señalización antidiferenciación generada por el nicho a través de la activación de receptores de factores de crecimiento.

15 En resumen, identificamos dos moléculas pequeñas sintéticas nuevas con distintos mecanismos de acción a partir de un cribado fenotípico de alto rendimiento que aumentan en gran medida la supervivencia de las hESC después de disociación en células individuales. Dichas herramientas químicas y herramientas biológicas recién identificadas a través de caracterizaciones mecanísticas (p. ej., Ecad-Fc recombinantes definidas para la unión de hESC en cultivo adherente; anticuerpos activadores para una supervivencia y unión celular aumentadas) permitirán un cultivo más robusto de las hESC y facilitarán significativamente las aplicaciones de las hESC tales como direccionamiento génico o descubrimiento de fármacos. De forma más importante, las caracterizaciones mecanísticas en profundidad descubrieron mecanismos de nicho previamente no reconocidos que se requieren para sostener la supervivencia y proliferación de las hESC. Dicho nicho consiste en la interacción mediada por E-cadherina entre las hESC en sí mismas, interacción célula-ECM mediada por integrinas, y factores de crecimiento. Los estudios anteriores han apuntado a un papel importante de los factores de crecimiento en la autorrenovación de las hESC. Sin embargo, la activación completa de la señalización de los factores de crecimiento requiere no solo la presencia de los factores de crecimiento y receptores sino también una interacción con un microentorno particular. Cuando este entorno físico/estructural se destruye, los factores de crecimiento solos no son suficientes para la autorrenovación de las ESC.

20 Recientemente, se reportó que fibroblastos diferenciados generados a partir de hESC en cultivo de autorrenovación crearon un nicho *in vitro* para las hESC (Bendall, S. C. et al., *Nature* 448 (7157): 1015-1021 (2007)). En nuestras, y de otros, condiciones de medio químicamente definido, observamos raramente dichas células diferenciadas en cultivo a largo plazo, sugiriendo que dicho nicho artificial podría crearse debido a diferencias en los medios. No obstante, nuestros estudios revelan mecanismos únicos de nicho autónomos de células (es decir, interacción célula-célula) y no autónomos de células (es decir, célula-ECM y -factor de crecimiento) para la supervivencia y autorrenovación de las hESC, que pueden jugar, probablemente, papeles importantes en el control del destino de las células madre adultas *in vivo*.

25 La disociación célula-célula por tripsina dio lugar no solo a la desestabilización de las E-cadherinas sino también a la inactivación de integrinas, indicando que la señalización que mantiene la actividad de las integrinas es sensible al tratamiento enzimático. El medio condicionado de células nutrientes (con suero rico en factores de crecimiento) no proporcionó mucha protección frente a la muerte celular después de la disociación en células individuales. Además, el hecho de que la siembra de células a alta densidad también induce un incremento en la adhesión/supervivencia celulares sugiere que la señalización requerida para mantener la actividad de las integrinas puede no venir de factores secretados sino de interacciones físicas célula-célula. Tzv inhibe la endocitosis de E-cadherina, y así protege a las células de la muerte en suspensión. De forma similar, mediante la inhibición de la endocitosis, Tzv puede mantener la actividad de las integrinas mediante la estabilización de la señalización desde la superficie celular. Por otra parte, Ptn puede mimetizar la señalización aguas abajo desde la interacción física célula-célula para activar la PKC. La identificación futura de dianas de Ptn puede arrojar nueva luz sobre el mecanismo por el que la adhesión célula-célula regula la interacción célula-ECM. Nuestra investigación también ejemplificó la idoneidad y avance de cribado químico de alto rendimiento en estudios de células madre. Un desarrollo y aplicación adicionales de dicha estrategia química

en las células madre dará lugar sin dudas a la identificación de nuevas moléculas pequeñas adicionales e información mecanística para controlar de manera precisa el destino de las células *in vitro* e *in vivo*.

Métodos

Cultivo celular

5 Las líneas de ESC humanas H1, HUES7 y HUES9 se cultivaron en células nutrientes MEF irradiadas en DMEM-F12 suplementado con L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, 20% de reemplazo de suero (Invitrogen) y 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (Invitrogen). El cultivo de hESC químicamente definido y sin células nutrientes se ha descrito previamente (Yao, S. et al., Proc Natl Acad Sci USA 103 (18):6907-6912 (2006)).
10 Brevemente, las hESC se crecieron en placas de cultivo tisular recubiertas con Matrigel en N2B27-CDM (DMEM-F12 suplementado con 1x suplementos de N2, 1x suplementos B27, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 0.11 mM, 1x aminoácidos no esenciales, y 0.5 mg/ml de BSA (fracción V)) y 20 ng/ml de bFGF. Las ESC humanas se subcultivaron cada 5-6 días con 0.05% de tripsina.

15 Para los ensayos de supervivencia clonal, se diluyeron hESC individuales hasta la densidad clonal y se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con Matrigel. Para los ensayos de supervivencia a baja densidad, se sembraron 500 células en placas de 96 pocillos recubiertas con Matrigel. Para visualizar las colonias de hESC, los cultivos se fijaron en 4% de paraformaldehído en PBS durante 5 min, se lavaron una vez en PBS, después se tiñeron para detectar la actividad fosfatasa alcalina como se describe en las instrucciones del fabricante. Las colonias positivas para ALP se contaron en un microscopio invertido.

Reactivos

20 El kit de detección de ALP y los anticuerpos frente a integrinas fueron de Chemicon. AG825 (inhibidor de Erb2), AG1478 (inhibidor de EGFR), PPP (inhibidor de IGFR1) se adquirieron en Calbiochem. Los anticuerpos producidos frente a la cola intracitoplásmica de E-cadherinas (Transduction Laboratories, Lexington, KY) se usaron para la inmunoprecipitación. El anticuerpo TS2/16 fue de Pierce. Los anticuerpos frente al dominio extracelular de la molécula de E-cadherina fueron de Zymed (Carlsbad). Los anticuerpos frente a la quinasa regulada por señal
25 extracelular/MAPK, EGFR1, ERB2, GADPH y la forma fosforilada de AKT fueron de Cell Signaling. El monoclonal antifosfotirosina de ratón (clon 4G-10) fue de Upstate Biotechnology. Ptn y Tzv se añadieron al medio de cultivo a 2 µM.

Cribado químico de alto rendimiento.

30 Las líneas de hESC tripsinizables HUES7 o HUES9 se usaron para el cribado. Las hESC se cultivaron en medio químicamente definido en la placa recubierta con Matrigel como se ha descrito anteriormente. Después, las células se recogieron con tripsina. Las hESC se sembraron en placas a 4 000 células por pocillo en placas de 384 pocillos recubiertas con Matrigel. Después de 1 h cuando las células se establecieron, se añadieron compuestos de una biblioteca de 50 000 heterociclos discretos a cada pocillo (concentración final 2 µM). Después de 6 días adicionales de incubación, en los que el medio y los compuestos se cambiaron en el día 3, las células se tiñeron para detectar la
35 expresión de ALP y se examinaron para detectar morfología de colonias compacta.

Análisis por inmunotinción.

40 La inmunotinción se realizó como se ha descrito previamente (Yao, S. et al., Proc Natl Acad Sci USA 103 (18):6907-6912 (2006)). Brevemente, las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído a temperatura ambiente (RT) durante 15 min. Las células se incubaron entonces a RT en tampón de bloqueo durante 1 hora. La incubación con anticuerpos primarios se llevó a cabo toda la noche a 4 °C. Se usaron los siguientes anticuerpos disponibles comercialmente a una concentración de 1:100 en tampón de bloqueo: anti-SSEA4, anti-Oct4 (Chemicon??) anti-Nanog (Chemicon). La tinción se visualizó usando anticuerpos secundarios conjugados con FITC, cy3 o cy5 (Jackson ImmunoResearch).

Formación de teratomas y cariotipado.

45 Los experimentos de formación de teratomas se realizaron inyectando 3-5 millones de hESC (mantenidas en presencia de los compuestos Tzv o Ptn) bajo la cápsula renal de ratones desnudos. Después de 4-5 semanas, todos los ratones desarrollaron teratomas, que se retiraron y se analizaron inmunohistológicamente por The Scripps Research Institute Research Histology Service and Animal Resources. Las células tratadas con los compuestos se cariotiparon por bandeado G estándar en el Children's Hospital Oakland, Cytogenetics Laboratory. No se encontraron anomalías cromosómicas en los 10 núcleos elegidos aleatoriamente

50 Ensayo TUNEL

Las hESC bajo diferentes tratamientos se disociaron con tripsina y se fijaron con 4 % de paraformaldehído. La tinción se llevó a cabo según 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, las células disociadas (3×10^5) se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS que contenía 2 % de suero de cabra. Las células se incubaron entonces con el anticuerpo apropiado durante 1 h a 4 °C, se lavaron con la disolución de bloqueo, y se marcaron con anticuerpo secundario conjugado con FITC durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron entonces 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 recubiertas con Matrigel. Después de la tripsina, las hESC se resuspendieron en el medio químicamente definido que contenía los compuestos deseados. Las células se añadieron entonces a los pocillos de microtitulación y se incubaron durante 3 h a 37 °C. Las células no unidas o poco unidas se retiraron agitando y lavando, y las células restantes se fijaron entonces inmediatamente. Los pocillos se lavaron 3 veces con 200 μ l de H₂O, y las células unidas se tiñeron con Cristal Violeta (Sigma). Se midió entonces la absorbancia de cada pocillo a 570 nm. Para los experimentos con anticuerpos bloqueantes, las células se preincubaron con anticuerpos en hielo durante 30 min, y los ensayos de adhesión se realizaron en presencia de anticuerpos. Cada muestra se ensayó independientemente tres veces.

Ensayo de endocitosis

Las hESC se incubaron con 1.5 mg/ml de sulfosuccinimidil 2-(biotinamido) etil-ditiopropionato (sulfo-NHS-SS-biotina) (Pierce Chemical Co.) en hielo, seguido de lavado y parada. La endocitosis de la E-cadherina se inició por la depleción de Ca²⁺ y la incubación a 37 °C. Las células se incubaron entonces en dos lavados de 20 min de disolución de glutatión (glutatión 60 mM, NaCl 0.83 M, con NaOH 0.83 M y 1 % de BSA añadida antes del uso) a 0 °C, lo que eliminó todos los grupos biotina de la superficie celular. Las proteínas biotiniladas restantes se secuestraron en el interior de las células por endocitosis y se protegieron, por lo tanto, del arrastre de glutatión. Las proteínas biotiniladas se recuperaron en lechos de estreptavidina y se analizaron por SDS-PAGE. Las E-cadherinas se detectaron por inmunotransferencia. El nivel total de 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)

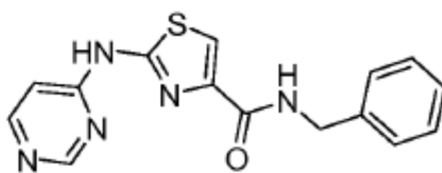
Síntesis química

Usando los ejemplos de síntesis química presentados más adelante y los métodos de síntesis química conocidos generalmente en la técnica, un experto en la técnica es capaz de preparar los compuestos descritos en la presente memoria (es decir, los compuestos de fórmula (II)).

Todos los productos químicos obtenidos comercialmente se usaron sin más purificación. 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 reportan en Hz. La LCMS se realizó por cromatografía líquida en fase reversa-espectrómetro de masa sistema de LCMS Agilent 1100 con fuente de ionización API-ES. La cromatografía líquida de alta presión se realizó con una columna C18 con un gradiente lineal de 10 % de disolvente A (acetonitrilo con 0.035 % de ácido trifluoroacético) en disolvente B (agua con 0.05 % de ácido trifluoroacético) a 90 % de A en siete minutos y medio, seguido de dos minutos y medio de elución con 90 % de A.

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

Se cargó bencil amina en una resina de poliestireno funcionalizada con 4-formil-3,5-dimetoxifenoximetilo (PAL) mediante aminación reductora para proporcionar una resina PAL-bencil amina. 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 PAL-bencil amina (200 mg, 0.2 mmoles), ácido 2-bromotiazol-4-carboxílico (83 mg, 0.4 mmoles), cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BOP-Cl) (153 mg, 0.6 mmoles) 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 *in vacuo* para proporcionar resina PAL-*N*-bencil-2-bromotiazol-4-carboxamida, que se añadió entonces a un vial de reacción secado con llama, seguido de 4-aminopirimidina (95 mg, 1 mmol), Pd₂(dba)₃ (46 mg, 0.05 mmoles), Xantphos (87 mg, 0.15 mmoles) y NaO^tBu (192 mg, 2 mmoles). El vial se tapó de manera segura y se desgasificó, después 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 disolución de dietilditiocarbamato de sodio (0.05 M en DMF), metanol y diclorometano y se secó *in vacuo*. La resina se escindió posteriormente con mezcla de escisión TFA:CH₂Cl₂:H₂O (45:55:5) (2 mL) durante 2 h. La resina se filtró, el filtrado se recogió y se evaporó *in vacuo* para proporcionar el crudo que se purificó entonces por HPLC para proporcionar el compuesto del título (30 mg, 48 %).

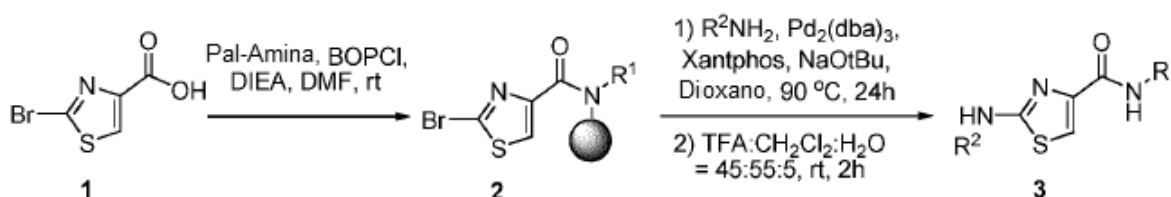


N-Bencil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida

Masa exacta calculada para $C_{15}H_{13}N_5OS$: 311.1, encontrado LCMS m/z = 334.1 ($M+Na^+$).

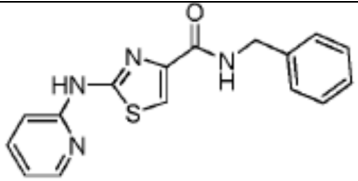
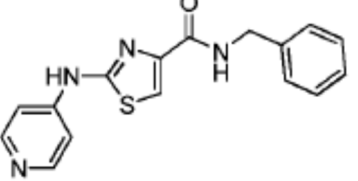
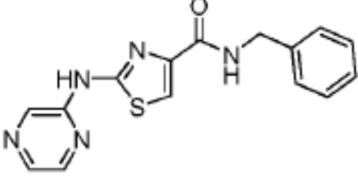
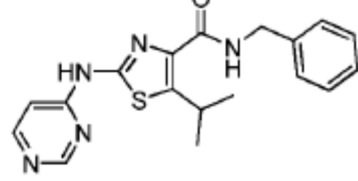
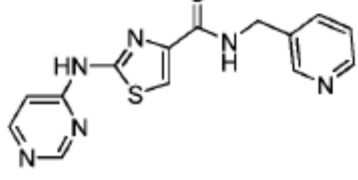
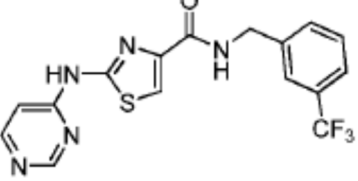
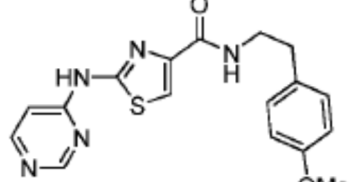
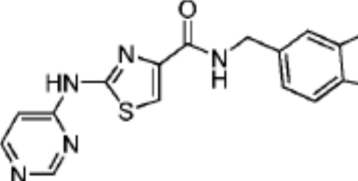
1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO) 4.49 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 5.76 (s, 1H), 7.21-7.27 (m, 2H), 7.30-7.34 (m, 4H), 7.85 (s, 1H), 8.45 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.51 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H).

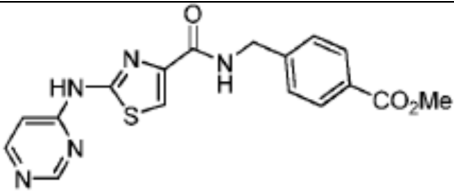
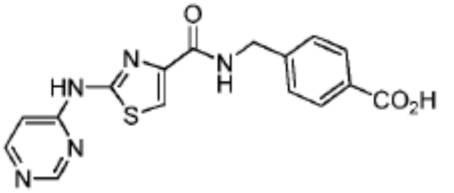
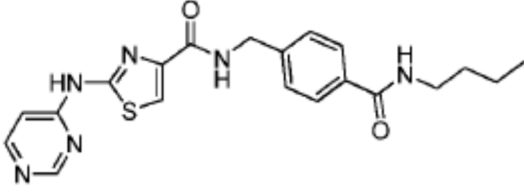
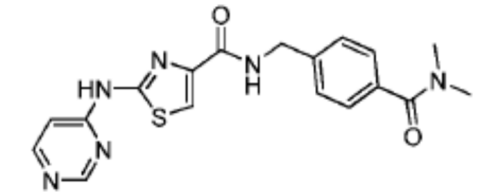
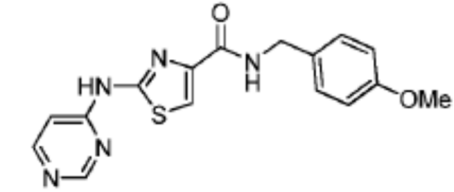
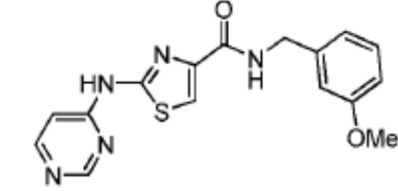
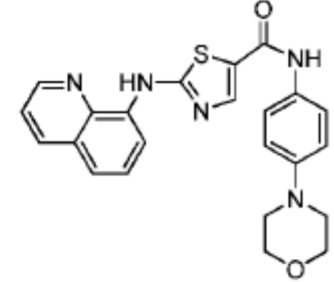
Ejemplo 3: Síntesis de derivados de tiazovivina



Las aminas R^1NH_2 apropiadas se precargaron en resina de poliestireno funcionalizada con 4-formil-3,5-dimetoxifenoximetilo (PAL) mediante aminación reductora para proporcionar resina PAL-bencil amina. Una mezcla de resina PAL-bencil amina (200 mg, 0.2 mmoles, 1.0 eq.), ácido 2-bromotiazol carboxílico 1 (0.4 mmoles, 2.0 eq.), cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BOP-Cl) (0.6 mmoles, 3.0 eq.) y diisopropiletilamina (1 mmol, 5.0 eq.) en DMF anhidro (3 mL) se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La resina se lavó con metanol, diclorometano y se secó *in vacuo*, que se añadió entonces a un vial de reacción secado con llama, seguido de la R^2NH_2 correspondiente (1 mmol, 5.0 eq.), $Pd_2(dba)_3$ (0.05 mmoles), Xantphos (0.15 mmoles) y NaO^tBu (2 mmoles, 10.0 eq.). El vial se tapó de forma segura y se desgasificó, después 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 disolución de dietilditiocarbamato de sodio (0.05 M en DMF), metanol y diclorometano y se secó *in vacuo*. La resina se escindió posteriormente con mezcla de escisión: TFA: CH_2Cl_2 : H_2O = 45:55:5 (2 mL) durante 2 h. La resina se filtró y el filtrado se recogió y se evaporó *in vacuo* para proporcionar el crudo que se purificó entonces por HPLC para proporcionar el compuesto del título 3 deseado. Los compuestos marcados con un asterisco (*) en la Tabla siguiente no son compuestos según la fórmula (II).

Estructura	Nombre	Datos
	N-bencil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS R_t = 1.49 min, $[MH^+]$ 312, $[MNa^+]$ 334.
	N-bencil-2-(6-metoxipirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida*	LC/MS R_t = 2.12 min, $[MH^+]$ 342.
	N-bencil-2-(fenilamino)tiazol-4-carboxamida*	LC/MS R_t = 2.45 min, $[MH^+]$ 310.

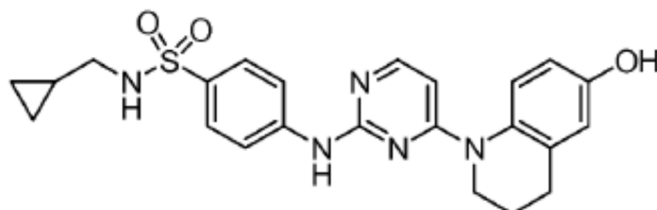
Estructura	Nombre	Datos
	N-bencil-2-(piridin-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida*	LC/MS R_t = 1.69 min, $[MH^+]$ 311.
	N-bencil-2-(piridin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS R_t = 1.57 min, $[MH^+]$ 311.
	N-bencil-2-(pirazin-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida*	LC/MS R_t = 2.02 min, $[MH^+]$ 312.
	N-bencil-5-isopropil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida	LC/MS R_t = 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.

Estructura	Nombre	Datos
	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)encil)-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida*	LC/MS [MH ⁺] 411.
	N-(4-(dimetilcarbamoil)encil)-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)

El matraz de reacción que contenía 2,4-dicloropirimidina (372 mg, 2.5 mmoles), 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (489 mg, 3 mmoles) y diisopropiletilamina (0.52 mL, 3 mmoles) en *n*-butanol (10 mL) se calentó a 40 °C toda la noche.

El disolvente se evaporó, y el residuo se purificó por cromatografía en columna flash para proporcionar 2-cloro-4-(6-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidina (551 mg, 80 %). Este intermedio (250 mg, 0.91 mmoles) se disolvió entonces en diclorometano y se trató con BBr_3 (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 orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna flash para proporcionar 2-cloro-4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidina (154 mg, 65 %). A una disolución agitada de 2-cloro-4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidina (29 mg, 0.11 mmoles) y 4-amino-*N*-(ciclopropilmetil)benzenosulfonamida (27 mg, 0.12 mmoles) en DMF (0.5 mL) se añadió ácido *p*-toluenosulfónico (2 M en dioxano) (55 μL , 0.11 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 90°C toda la noche, después se purificó por HPLC para proporcionar el compuesto del título (27 mg, 56 %).

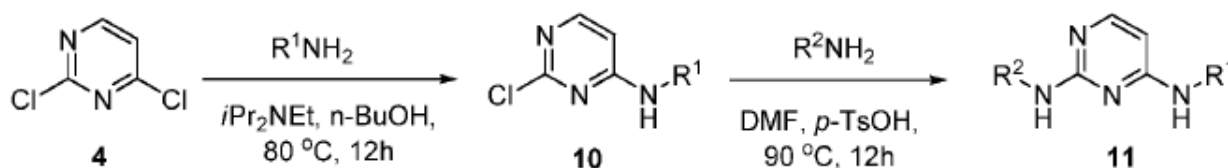


N-(Ciclopropilmetil)-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)benzenosulfonamida

Masa exacta calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$: 451.2, encontrado LCMS $m/z = 452.3$ ($\text{M}+\text{H}^+$).

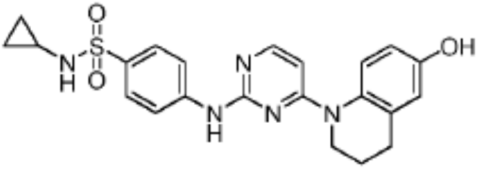
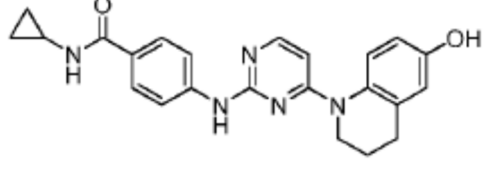
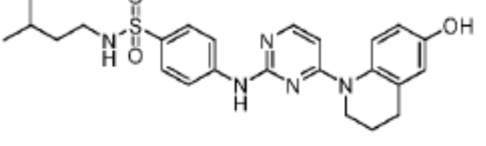
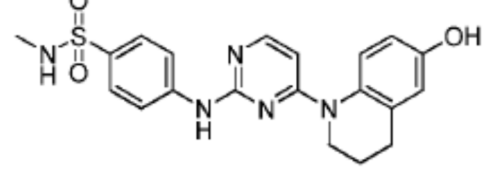
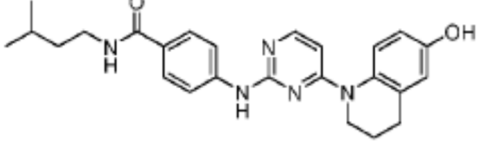
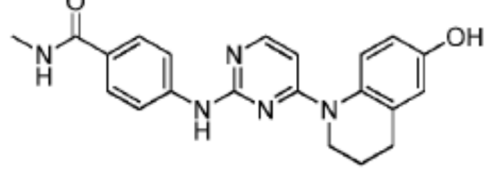
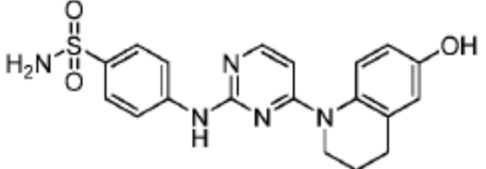
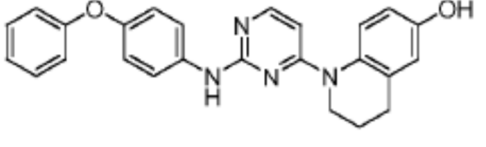
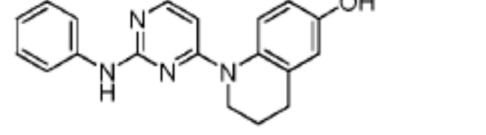
^1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO) 0.05-0.09 (m, 2H), 0.32-0.36 (m, 2H), 0.75-0.81 (m, 1H), 1.90-1.95 (m, 2H), 2.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H), 3.93 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 6.59 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.66-6.70 (m, 2H), 7.25-7.28 (m, 1H), 7.64 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.01 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 10.79 (s, 1H).

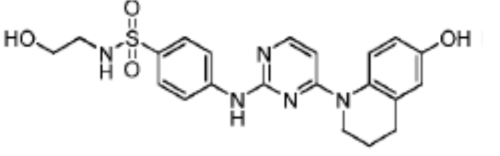
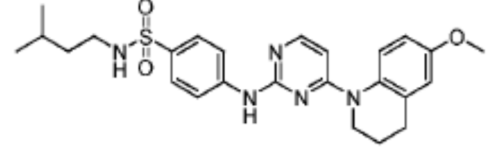
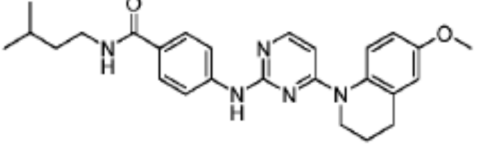
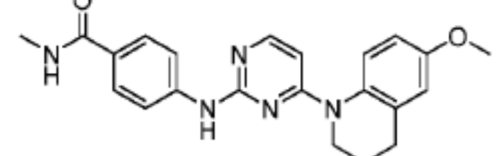
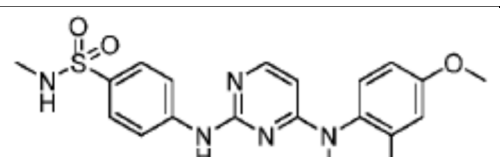
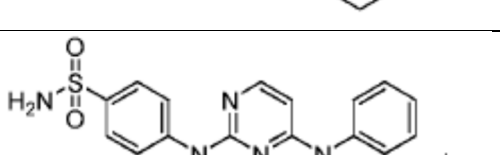
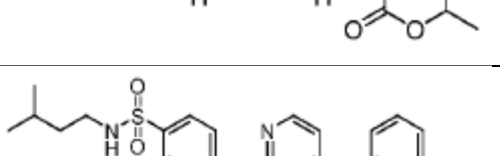
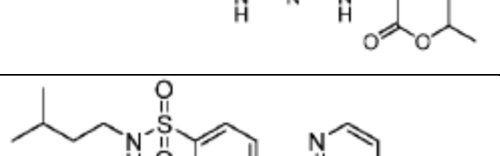
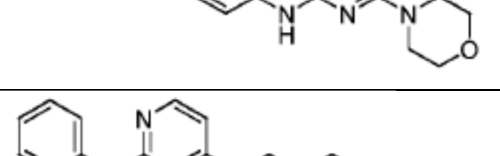
Ejemplo de referencia 5: Síntesis de derivados de pirintegrina

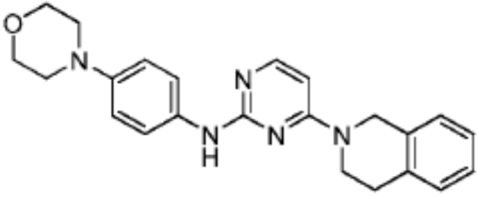
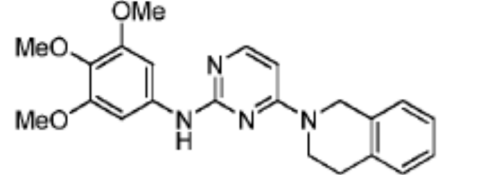
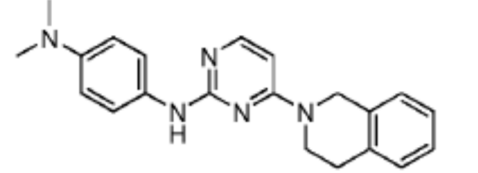
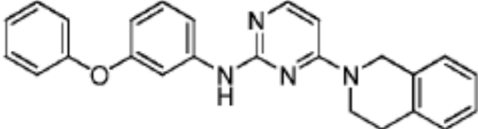
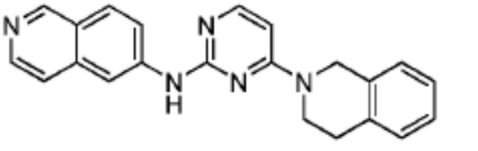
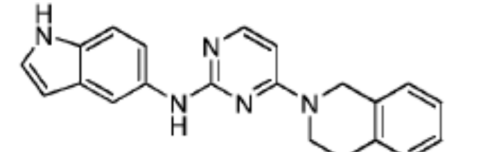
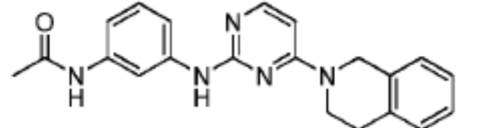
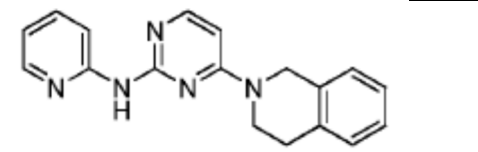
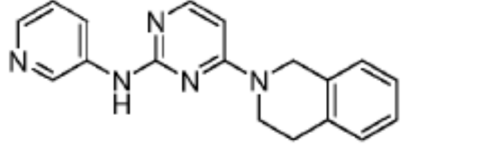


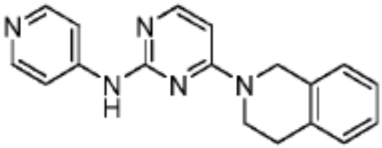
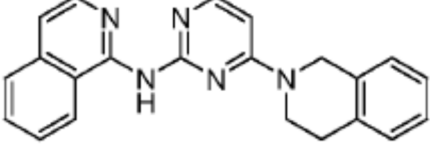
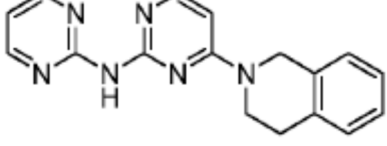
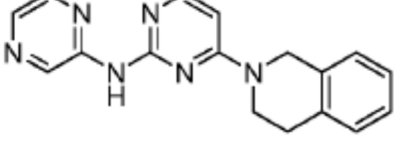
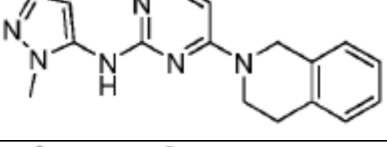
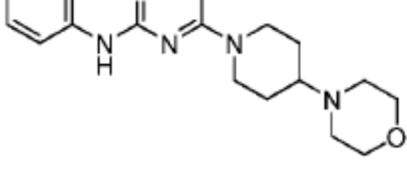
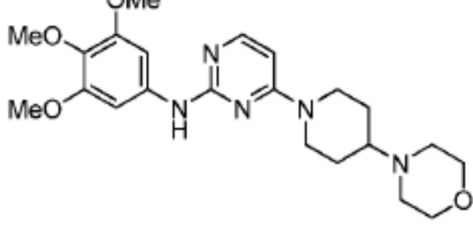
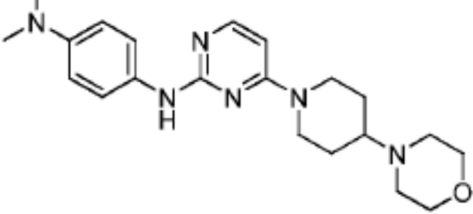
A una mezcla de 2,4-dicloropirimidina 4 (1.0 eq.), R^1NH_2 (1.2 eq.) y diisopropiletilamina (1.2 eq.) en *n*-butanol se calentó a 80°C toda la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna flash hasta el intermedio 10 con un rendimiento excelente ($> 80\%$), que se trató entonces con R^2NH_2 (1.2 eq.) en DMF se añadió ácido *p*-toluenosulfónico (2 M en dioxano) (1.2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 90°C toda la noche, y después se purificó directamente por HPLC preparativa para proporcionar los derivados de Pirintegrina 11 con rendimientos excelentes.

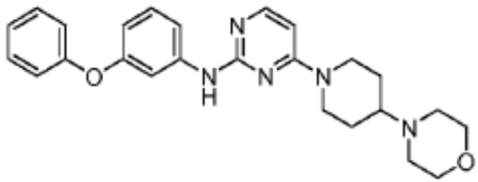
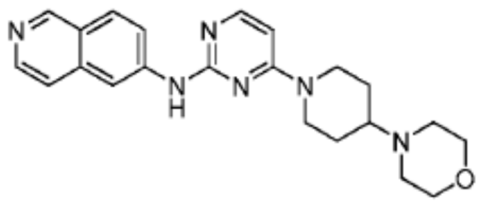
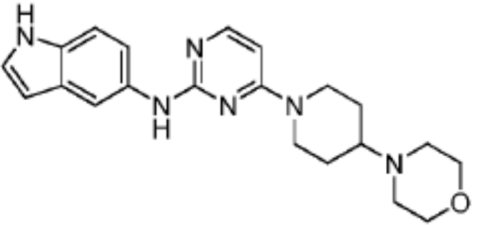
Estructura	Nombre	Datos
	<i>N</i> -(ciclopropilmetil)-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)benzenosulfonamida	LC/MS [MH^+] 452.
	<i>N</i> -(ciclopropilmetil)-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)benzamida	LC/MS [MH^+] 416.

Estructura	Nombre	Datos
	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.
	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)benzenosulfonamida	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.

Estructura	Nombre	Datos
	4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)pirimidin-2-ilamino)-N-(2-hidroxietil)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.
	2-(2-(4-(N-isopentilsulfamoil)fenilamino)pirimidin-4-ilamino)benzoato de isopropilo	LC/MS [MH ⁺] 498.
	N-isopentil-4-(4-morfolinopirimidin-2-ilamino)bencenosulfonamida	LC/MS [MH ⁺] 406.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-fenilpirimidin-2-amina	LC/MS R _t = 2.03 min, [MH ⁺] 303.

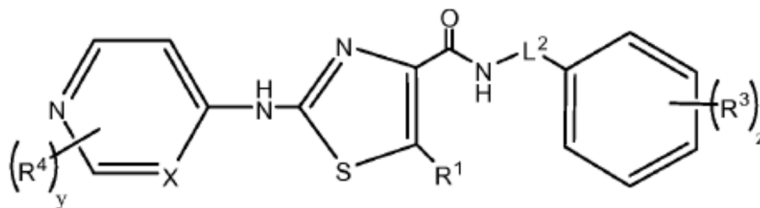
Estructura	Nombre	Datos
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(4-morfolinofenil)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.84 min, $[MH^+]$ 388.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.95 min, $[MH^+]$ 393.
	N1-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-il)-N4,N4-dimetilbenceno-1,4-diamina	LC/MS R_t = 1.49 min, $[MH^+]$ 346.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(3-fenoxifenil)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 2.36 min, $[MH^+]$ 395.
	N-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-il)isoquinolin-6-amina	LC/MS R_t = 1.51 min, $[MH^+]$ 354.
	N-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-il)-1H-indol-5-amina	LC/MS R_t = 1.96 min, $[MH^+]$ 342.
	N-(3-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-ilamino)fenil)acetamida	LC/MS R_t = 1.80 min, $[MH^+]$ 360.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(piridin-2-il)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.95 min, $[MH^+]$ 304.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(piridin-3-il)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.42 min, $[MH^+]$ 304.

Estructura	Nombre	Datos
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(piridin-4-il)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.40 min, $[MH^+]$ 304.
	N-(4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)pirimidin-2-il)isoquinolin-1-amina	LC/MS R_t = 2.20 min, $[MH^+]$ 354.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(pirimidin-2-il)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.70 min, $[MH^+]$ 305.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(pirazin-2-il)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.56 min, $[MH^+]$ 305.
	4-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.64 min, $[MH^+]$ 307.
	4-(4-morfolinopiperidin-1-il)-N-fenilpirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 0.97 min, $[MH^+]$ 340.
	4-(4-morfolinopiperidin-1-il)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)pirimidin-2-amina	LC/MS R_t = 1.11 min, $[MH^+]$ 430.
	N1,N1-dimetil-N4-(4-(4-morfolinopiperidin-1-il)pirimidin-2-il)benzeno-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. Una composición que comprende un compuesto que tiene la fórmula (II):



(II)

y células aisladas que comprenden células madre, células progenitoras, o células diferenciadas de ellas,

5 en donde,

L² es alquileo C₁-C₆ no sustituido; 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=;

10 R¹ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

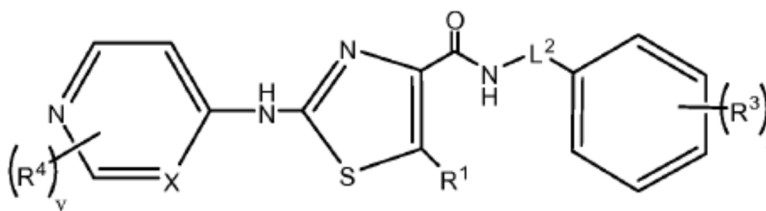
R³ es OR¹⁸, y R¹⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀ no sustituido;

15 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)₂N(R¹⁹)₂, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en 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 no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

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

2. La composición de la reivindicación 1, que comprende una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto que tiene la fórmula (II).

25 3. Un medio de cultivo celular que comprende un compuesto de fórmula (II):



(II)

en donde,

L² es alquileo C₁-C₆ no sustituido; e

y es un número entero de 0 a 3;

30 z es un número entero de 0 a 5;

X es -N=, -CH= o -CR⁵=;

R¹ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

R³ es OR¹⁸, y R¹⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀ no sustituido;

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)₂N(R¹⁹)₂, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en 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 no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

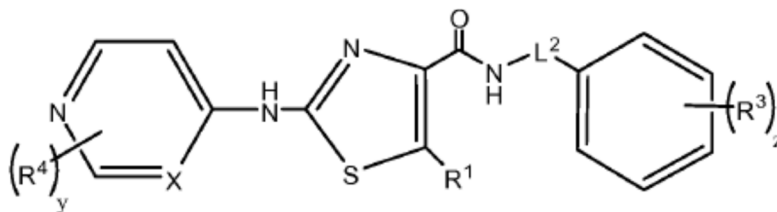
o un racemato, diastereómero, tautómero, o un isómero geométrico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El medio de cultivo celular de la reivindicación 3, en donde el medio es un medio de cultivo celular químicamente definido.

5. Un método para aumentar la supervivencia y proliferación celulares, método que comprende:

(a) obtener células aisladas que comprenden células madre, células progenitoras, o células diferenciadas de ellas; y

(b) poner en contacto las células aisladas con una cantidad de un compuesto que tiene la fórmula (II) suficiente como para mejorar la supervivencia de las células al menos 2 veces comparado con la ausencia del compuesto:



(II)

en donde,

L² es alquileo C₁-C₆ no sustituido; 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 no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

R³ es OR¹⁸, y R¹⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀ no sustituido;

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)₂N(R¹⁹)₂, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en 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 no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

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

6. El método de la reivindicación 5, en donde las células aisladas

(a) están en cultivos adherentes;

(b) están en cultivos en suspensión;

(c) son células individuales disociadas; o

(d) son células agregadas.

7. El método de la reivindicación 5, en donde la etapa de puesta en contacto comprende además:
subcultivar las células en cultivos que comprenden el compuesto que tiene la fórmula (II) durante al menos 5, 10, 15 o 20, o más generaciones.
8. El método de la reivindicación 7, en donde los cultivos:
- 5 (a) son químicamente definidos;
(b) carecen de células nutrientes o condicionado de células nutrientes; y/o
(c) carecen de productos animales.
9. El método de la reivindicación 5 o 7, en donde las células contactadas:
- 10 (a) permanecen homogéneas;
(b) mantienen la pluripotencia;
(c) expresan marcadores de pluripotencia;
(d) mantienen el cariotipo normal;
(e) son capaces de autorrenovación;
(f) tienen una muerte celular reducida;
- 15 (g) son capaces de formar teratomas;
(h) tienen una diferenciación celular reducida;
(i) son capaces de diferenciarse en tres capas germinales primarias;
(j) son capaces de diferenciación específica de linaje;
(k) son capaces de formar cuerpos embrioides después de la disociación en células individuales; y/o
- 20 (l) tienen una capacidad de adhesión celular incrementada después de la disociación en células individuales.
10. El método de la reivindicación 5, en donde la etapa de puesta en contacto comprende además:
- (a) modular el nivel de E-cadherinas de la superficie celular que comprende (i) estabilizar las E-cadherinas en la superficie celular; y/o (ii) inhibir la endocitosis de las E-cadherinas; o
- 25 (b) modular la actividad de las integrinas que comprende (i) incrementar la expresión de las integrinas; y/o (ii) convertir a las integrinas en una conformación activa.

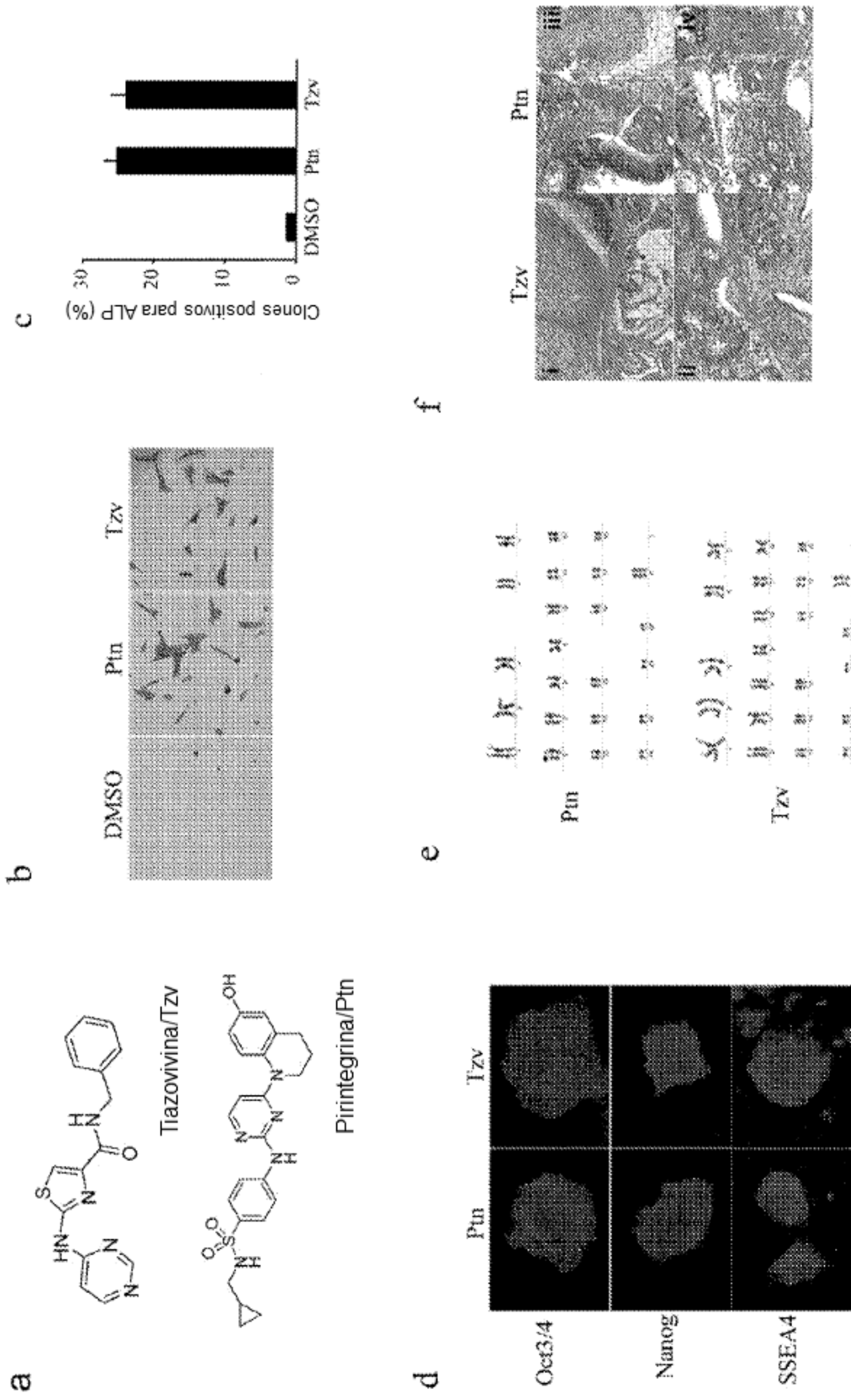


Figura 1

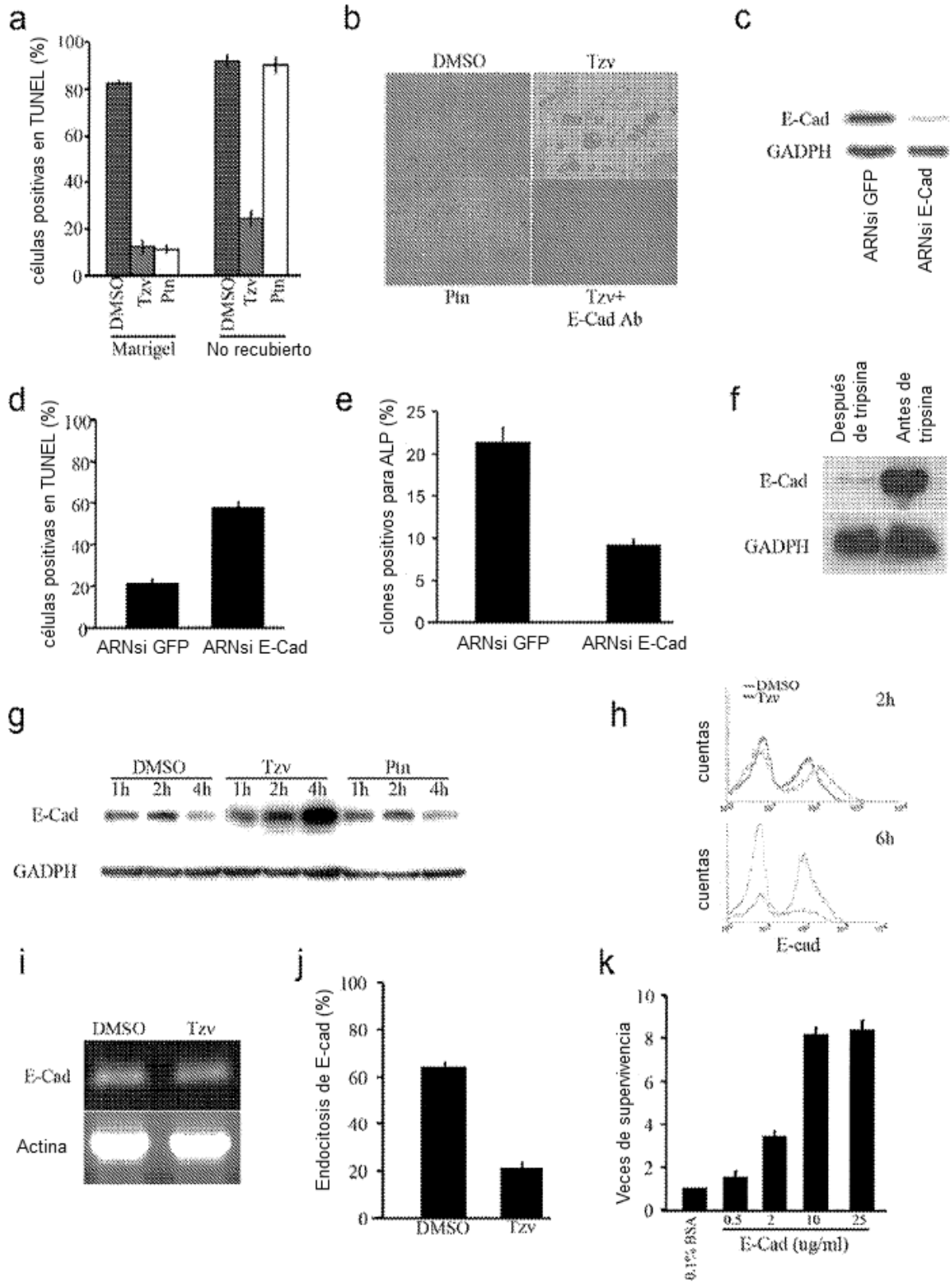


Figura 2

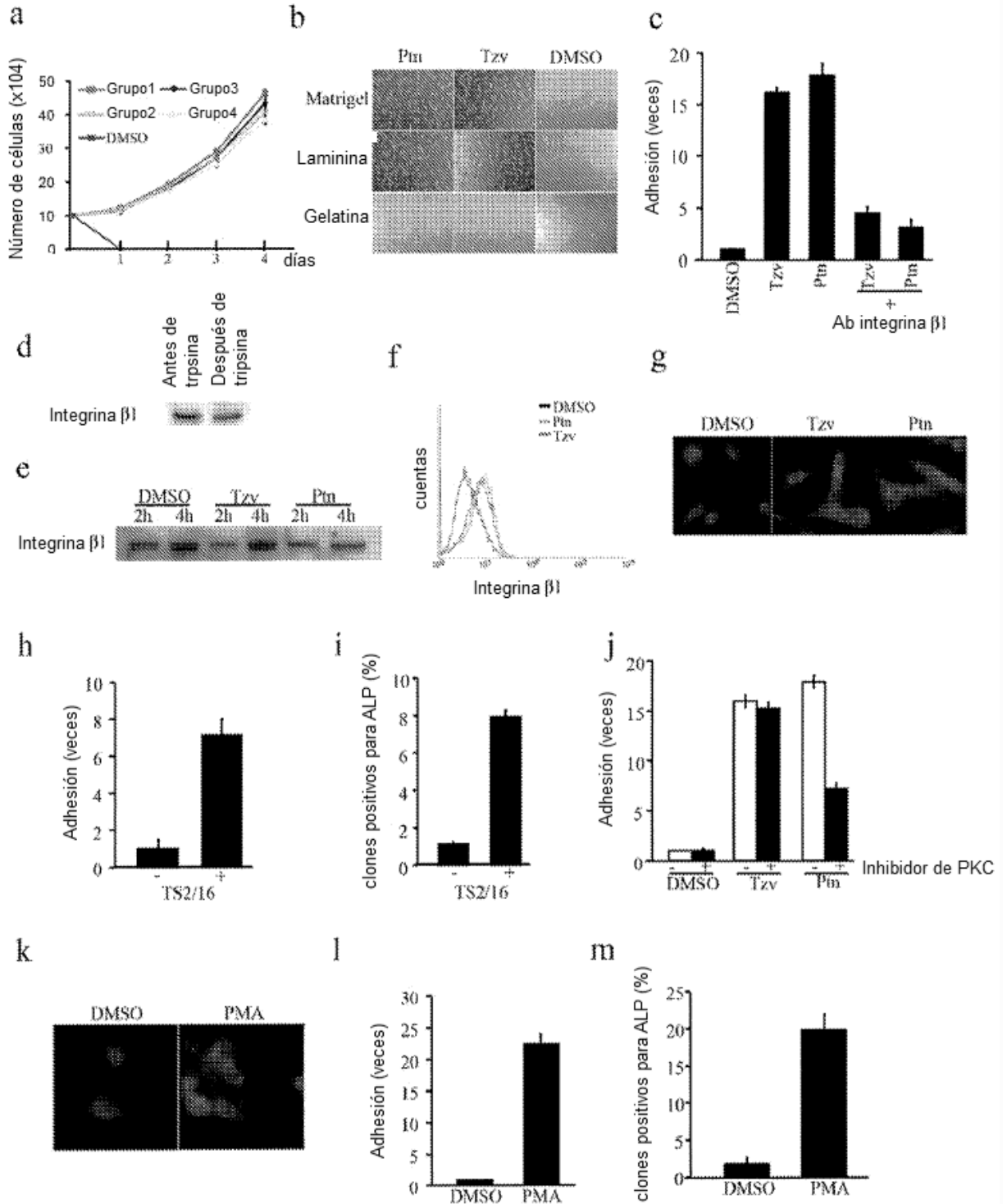


Fig.3

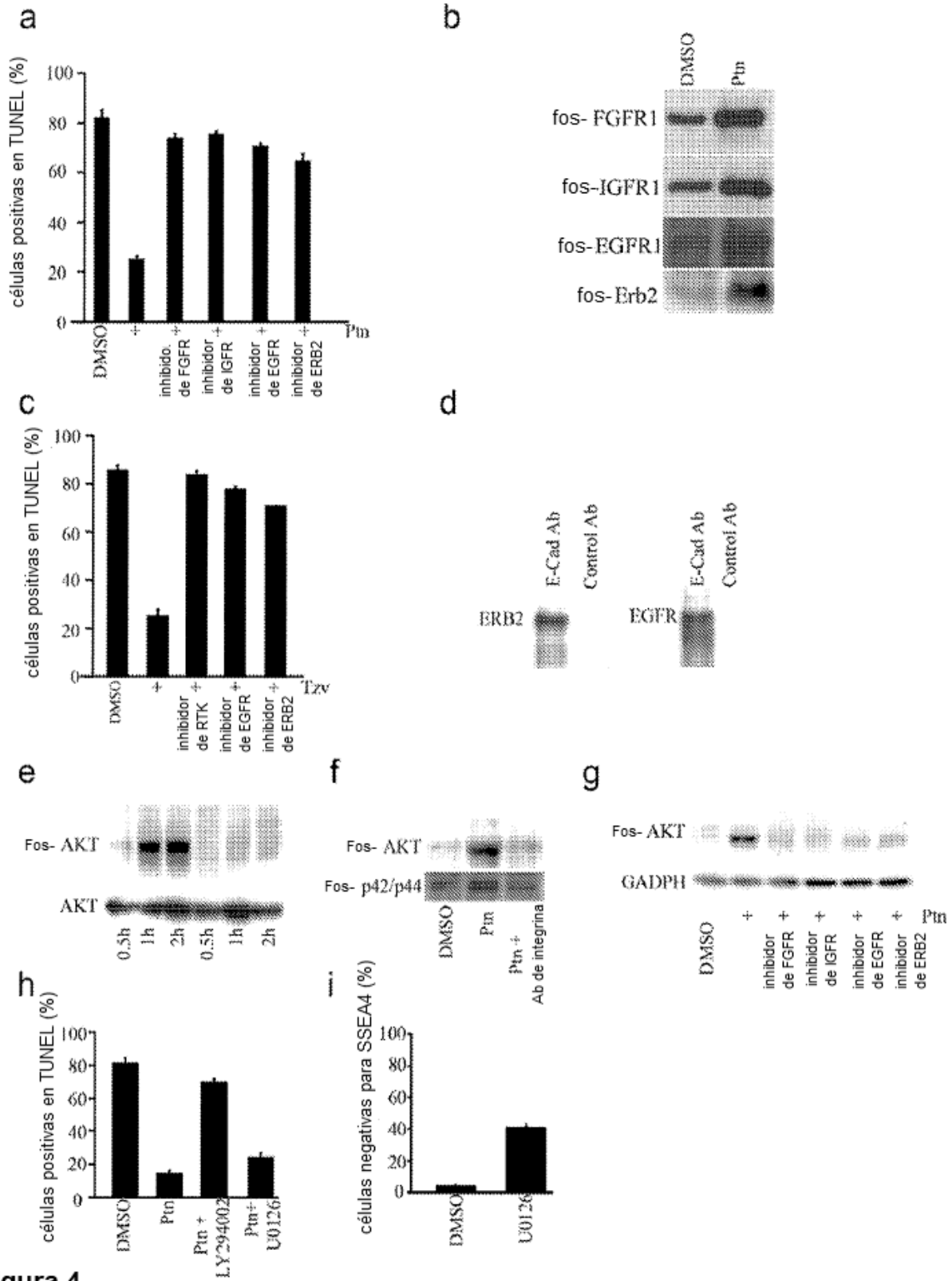
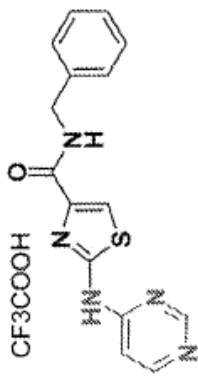


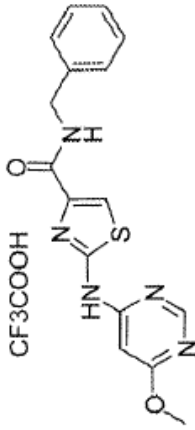
Figura 4

HHS-378 (Тиазоविрина/Тзв)



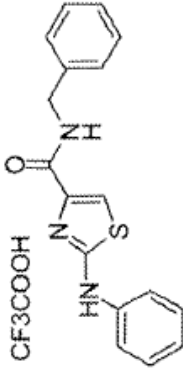
Masa Exacta: 311.08
Peso Molecular: 311.36

HHS-378-1



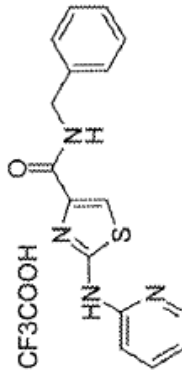
Masa Exacta: 455.09
Peso Molecular: 455.41

HHS-378-2



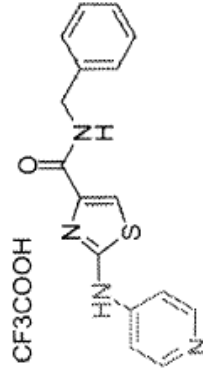
Masa Exacta: 423.09
Peso Molecular: 423.41

HHS-378-3



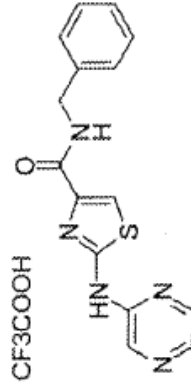
Masa Exacta: 424.08
Peso Molecular: 424.40 (*)

HHS-378-4



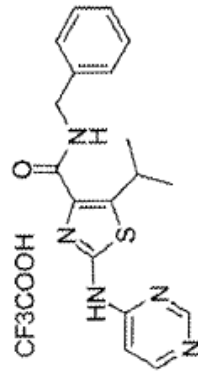
Masa Exacta: 424.08
Peso Molecular: 424.40

HHS-378-5



Masa Exacta: 425.08
Peso Molecular: 425.38

HHS-378-6



Masa Exacta: 467.12
Peso Molecular: 467.46

Figura 5A

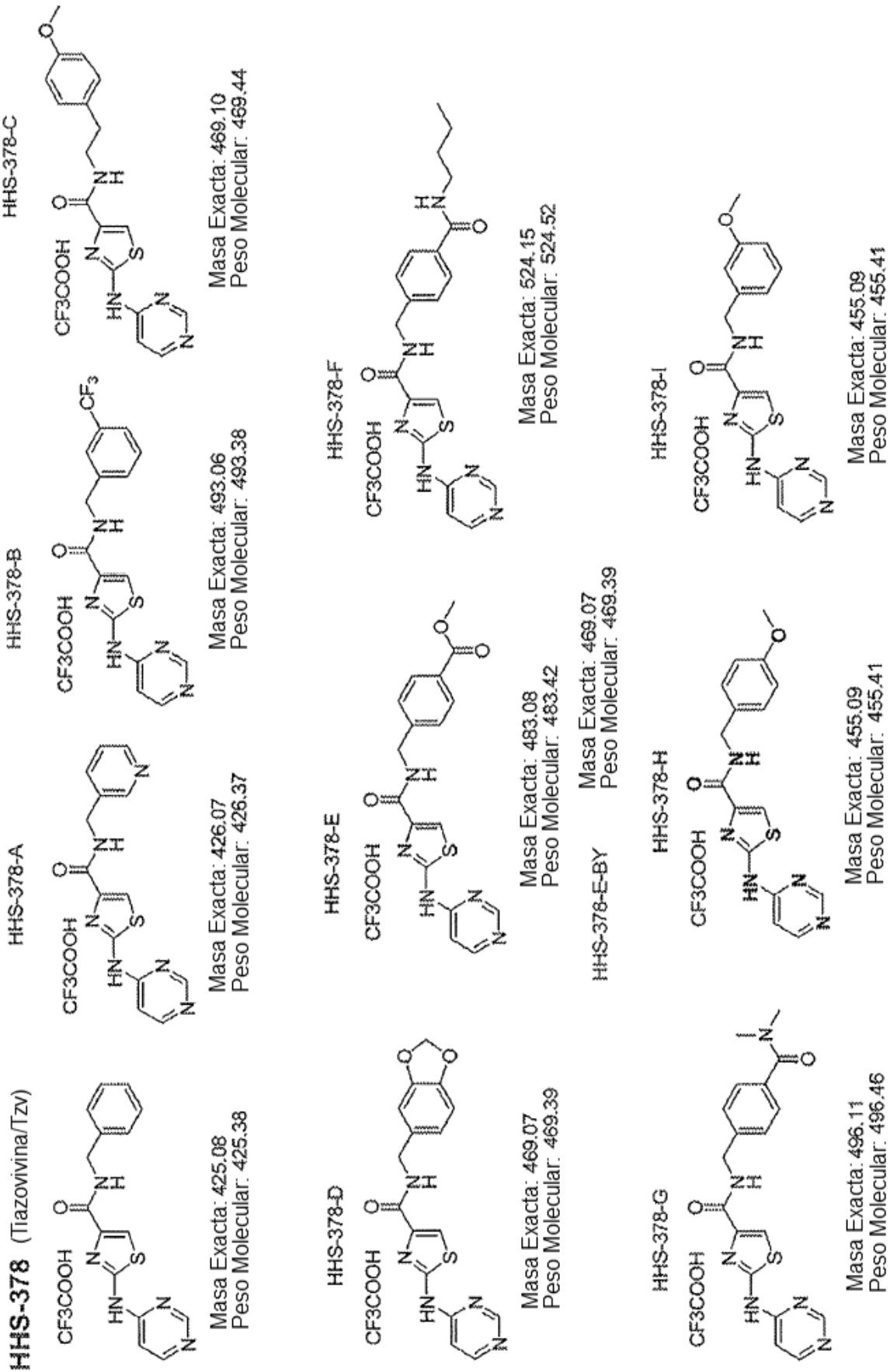


Figura 5B

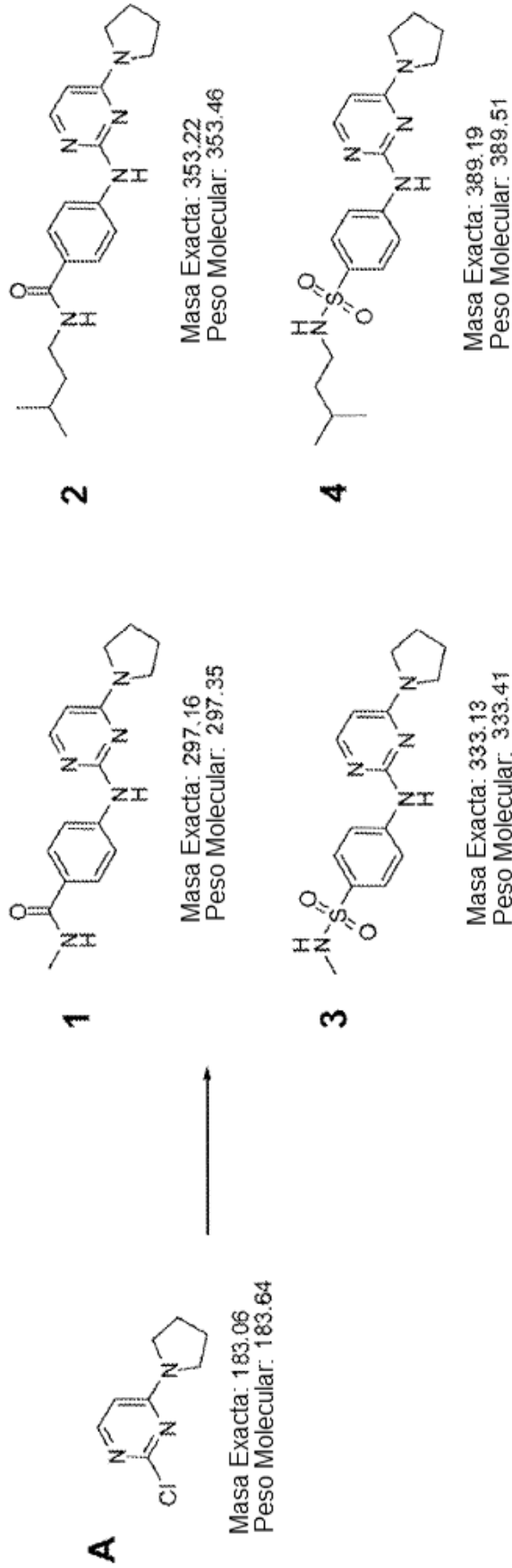


Figura 6A

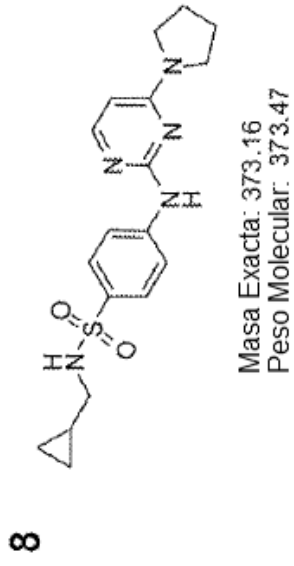
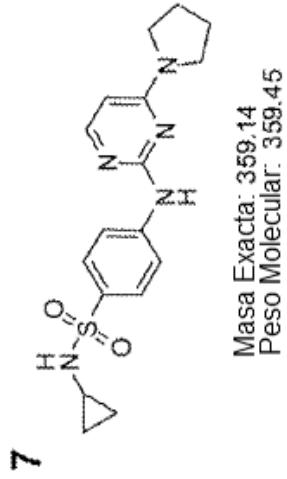
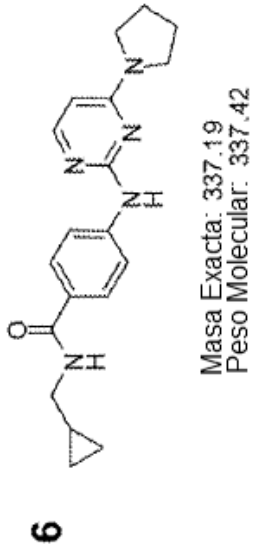
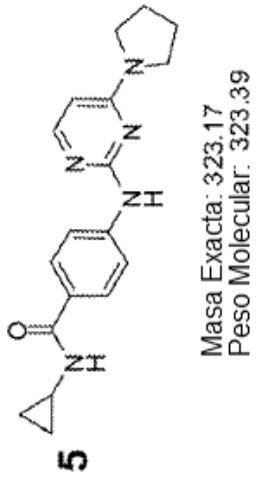
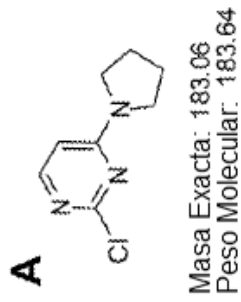


Figura 6B

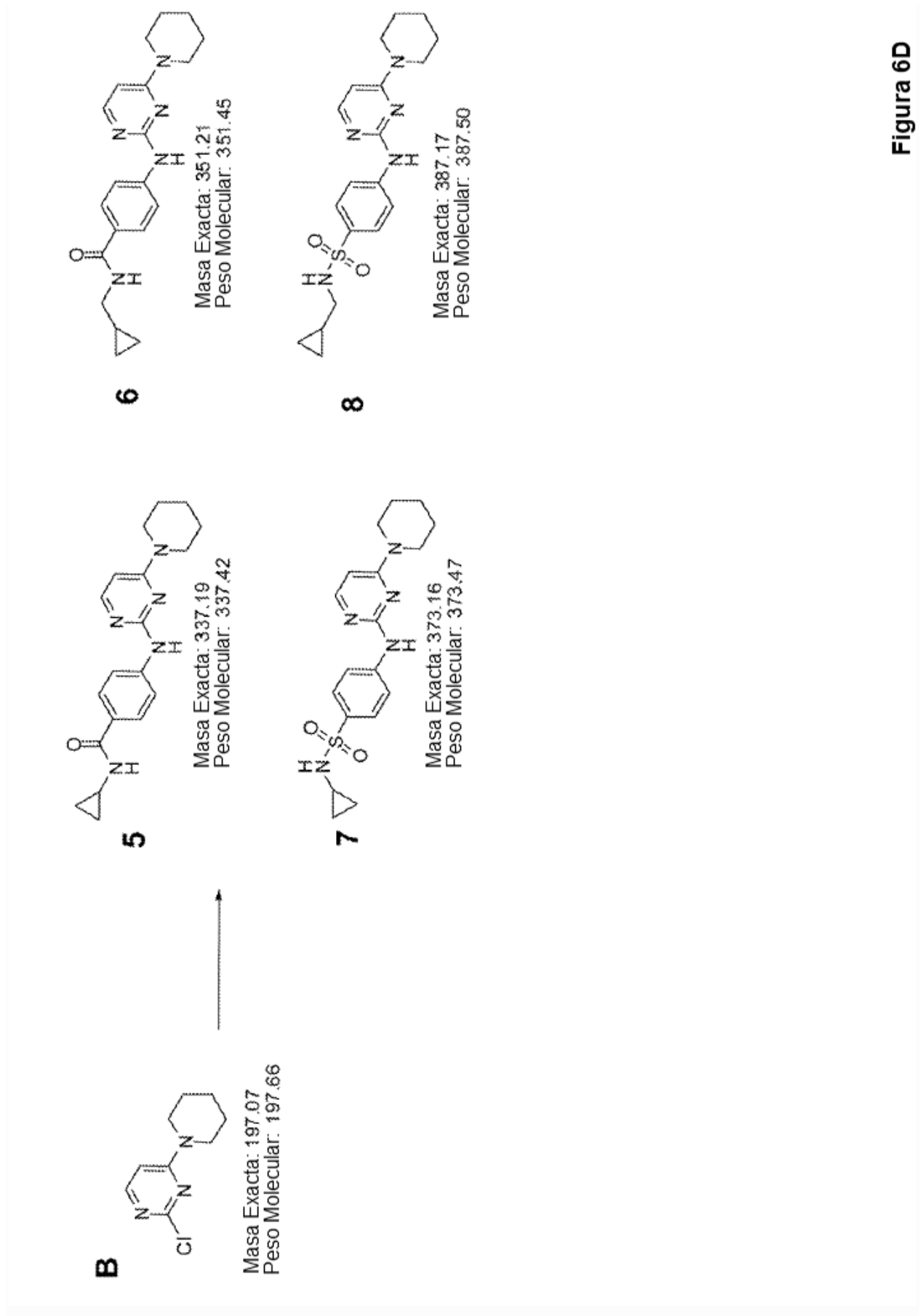


Figura 6D

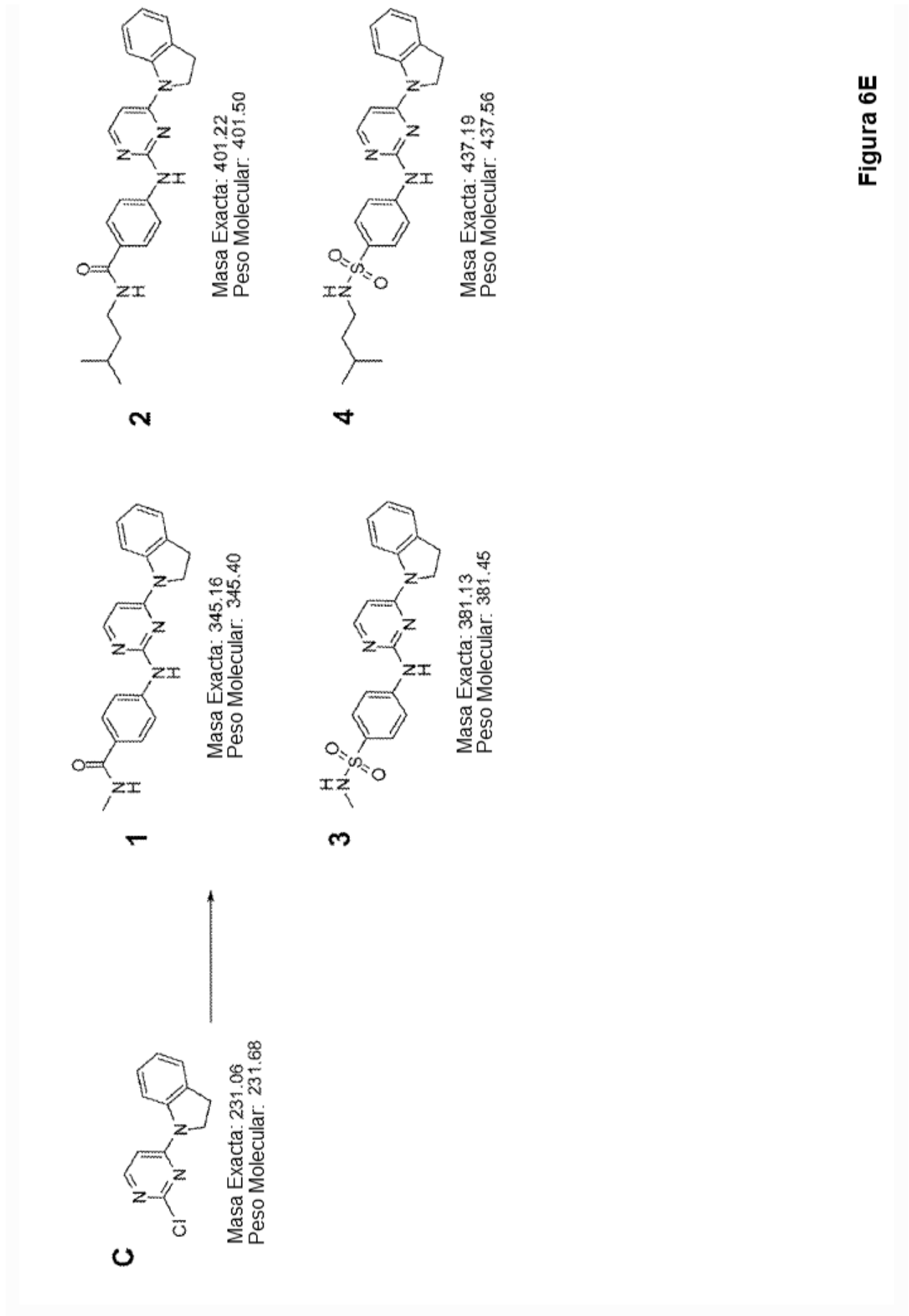


Figura 6E

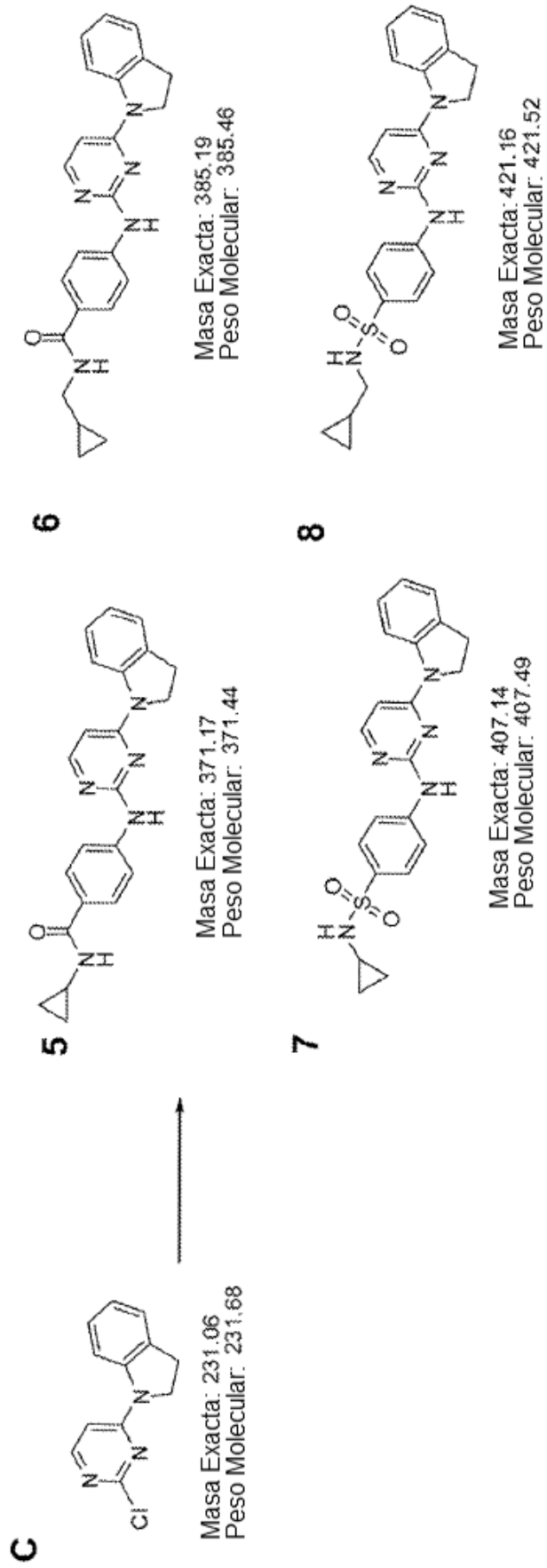


Figura 6F

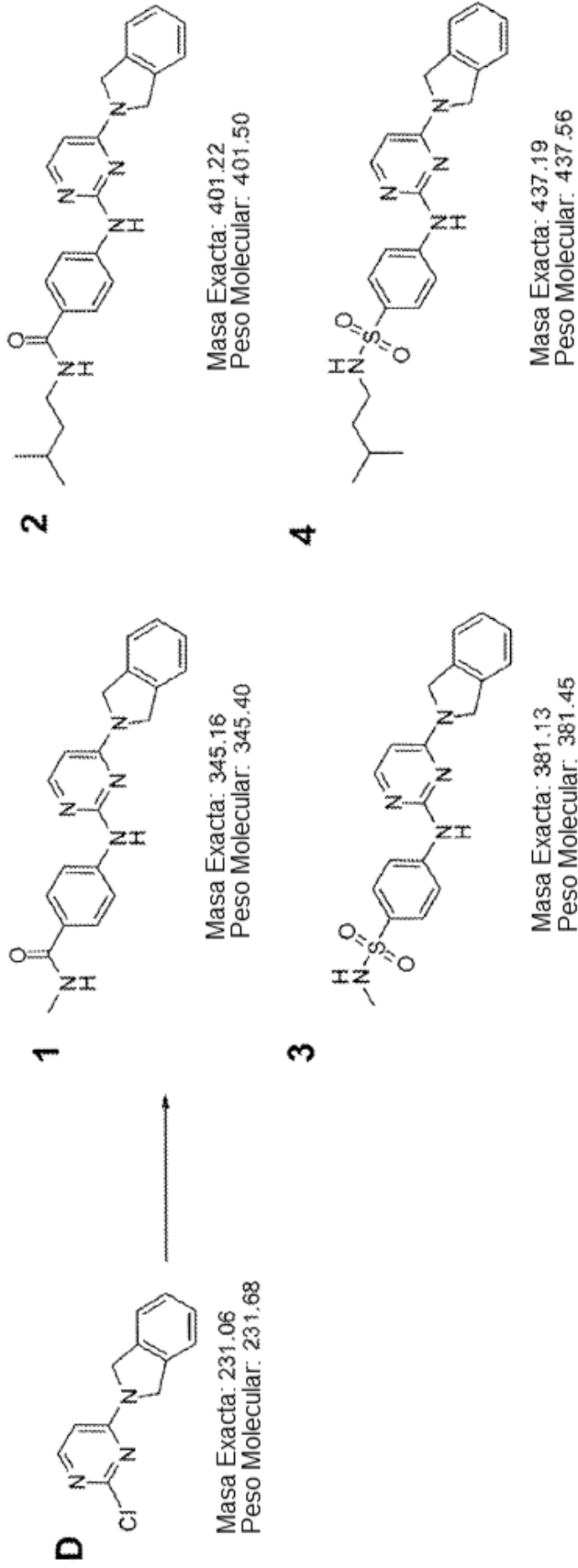


Figura 6G

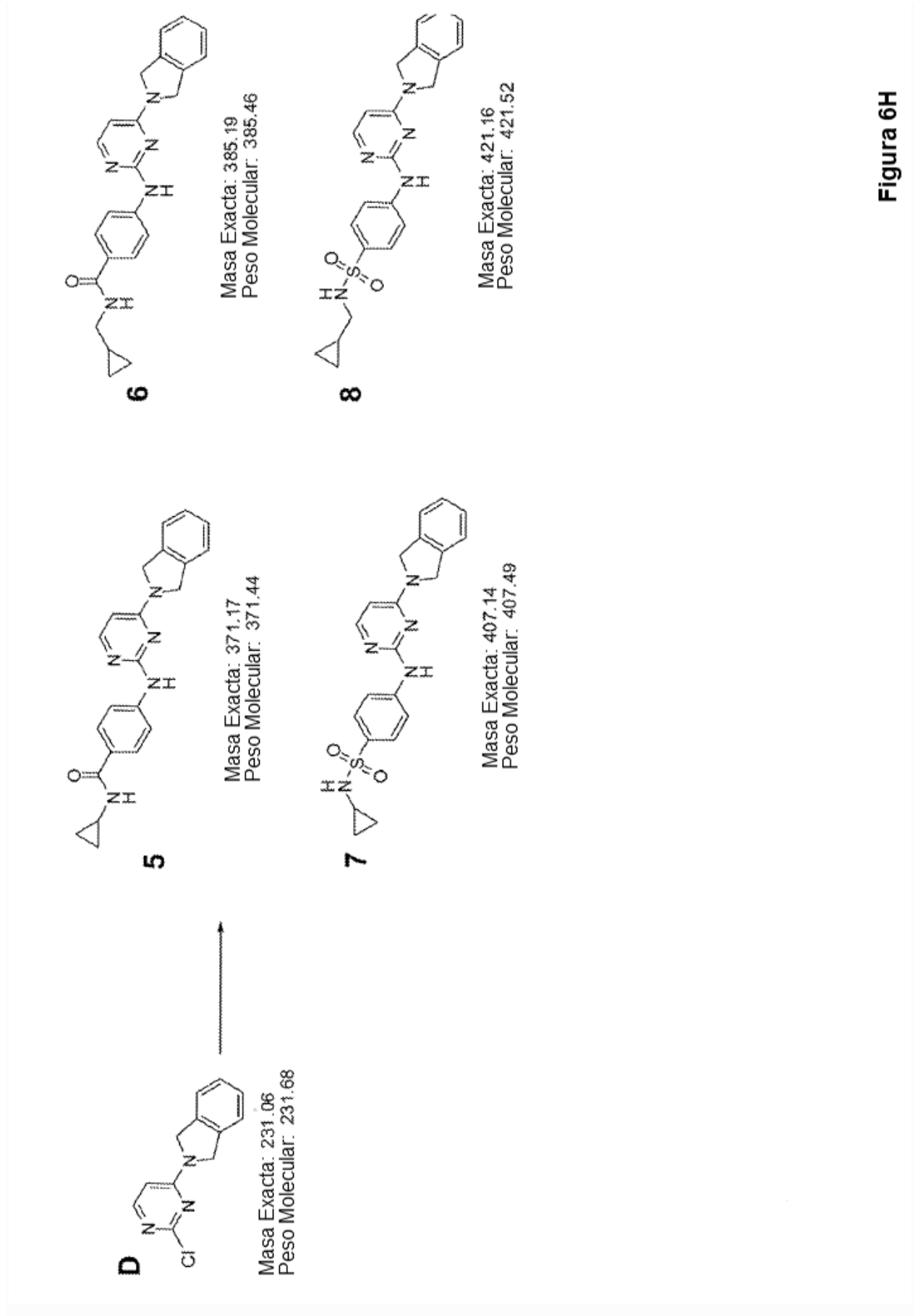


Figura 6H

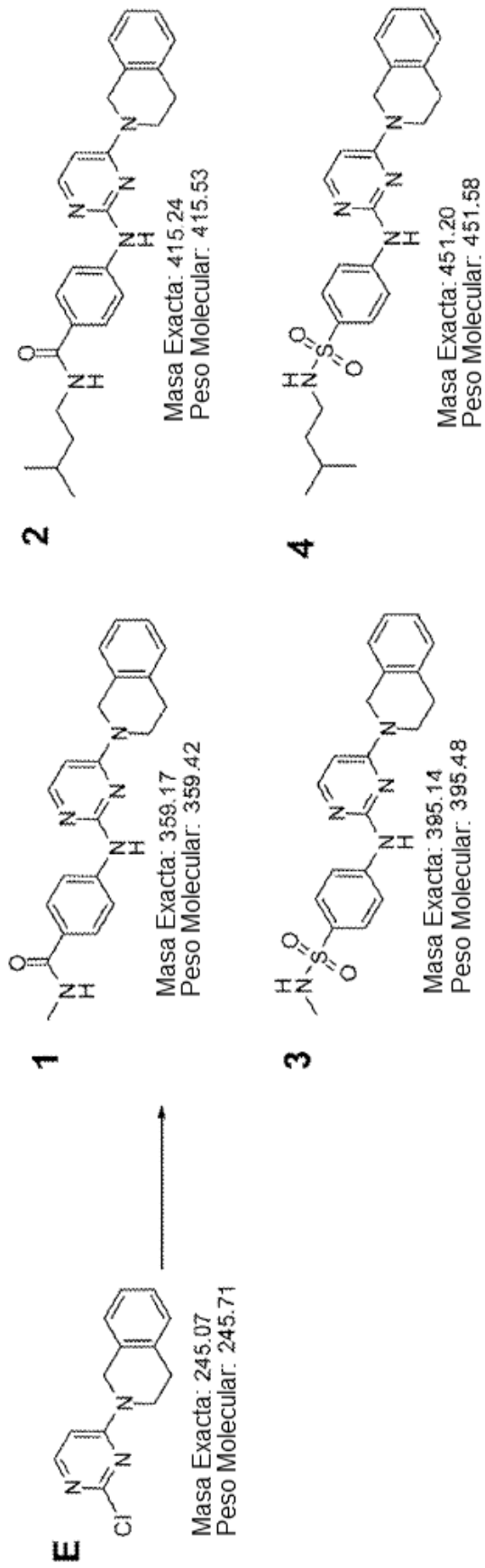


Figura 6I

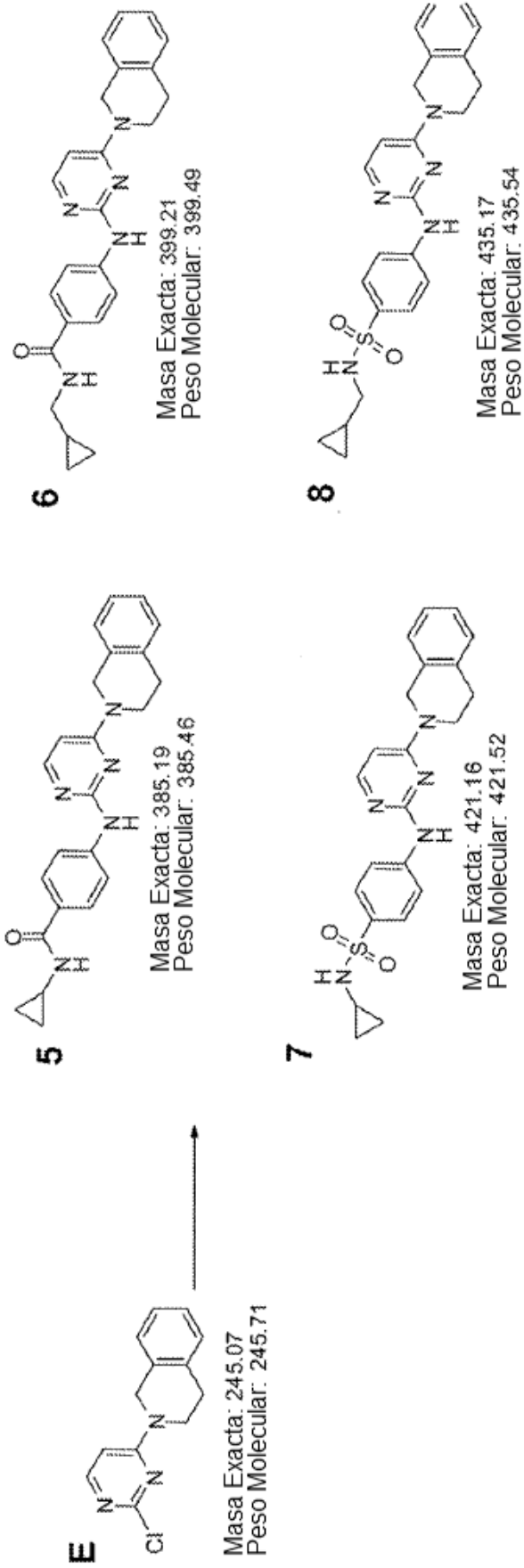


Figura 6J

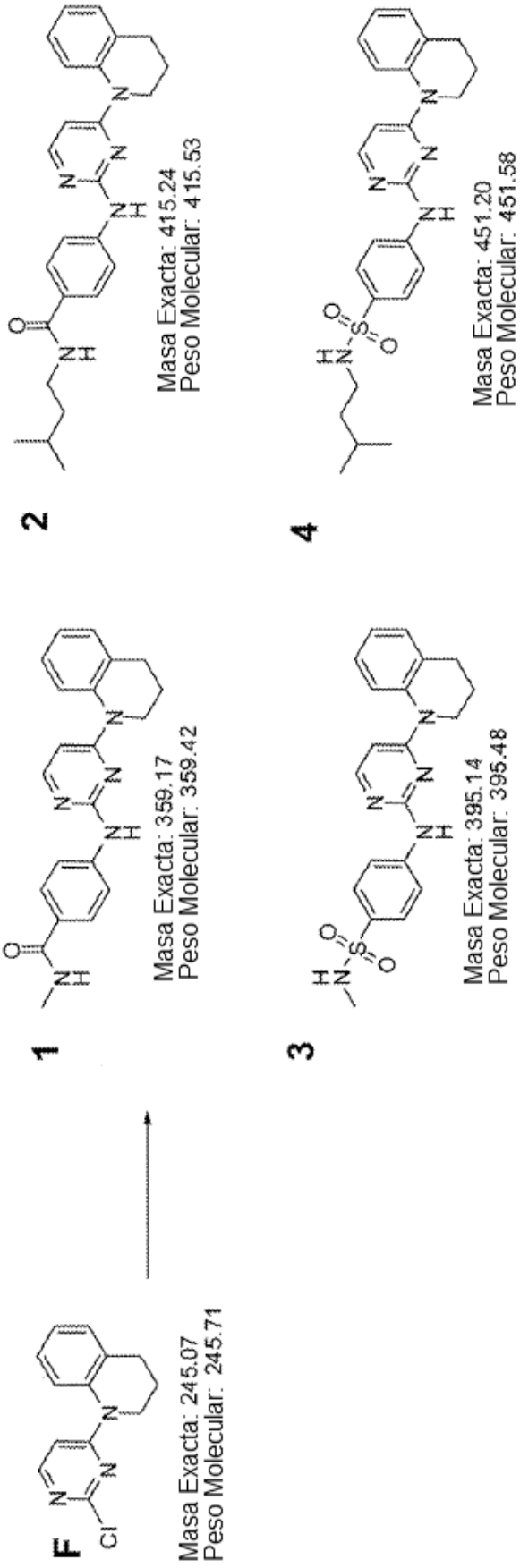


Figura 6K

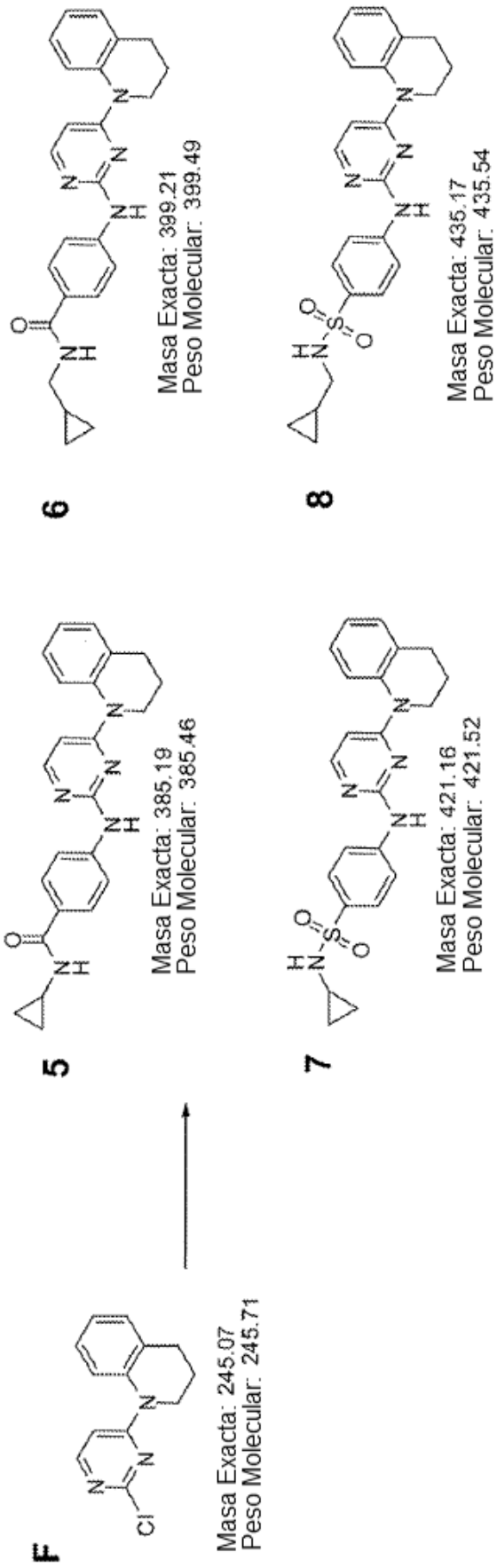


Figura 6L

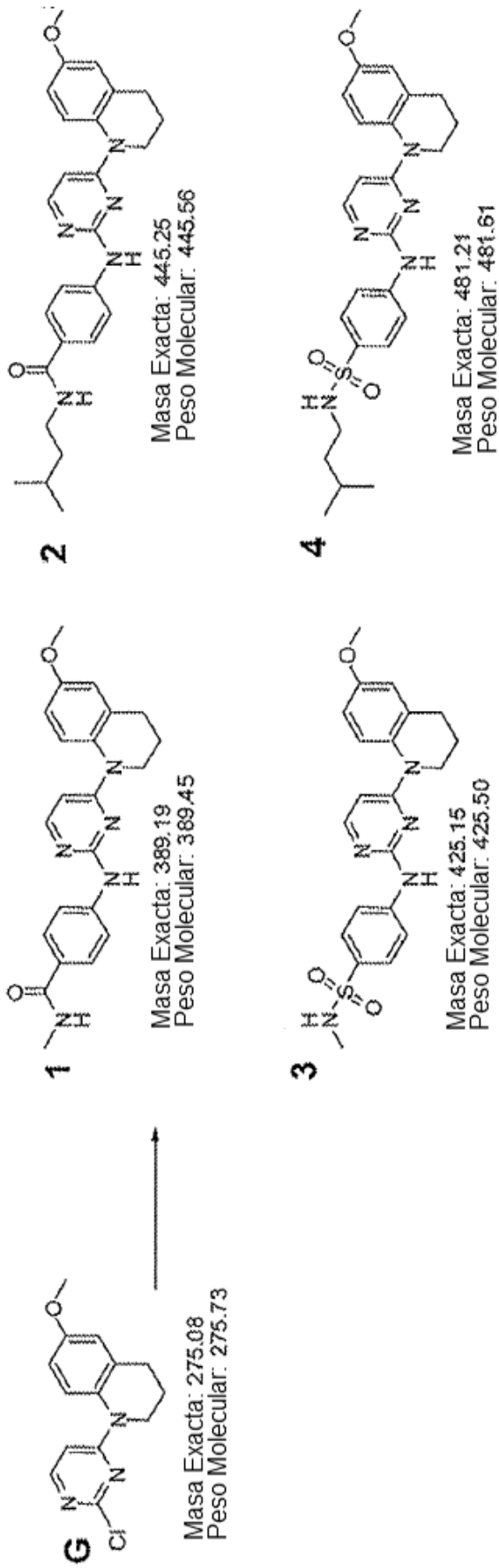


Figura 6M

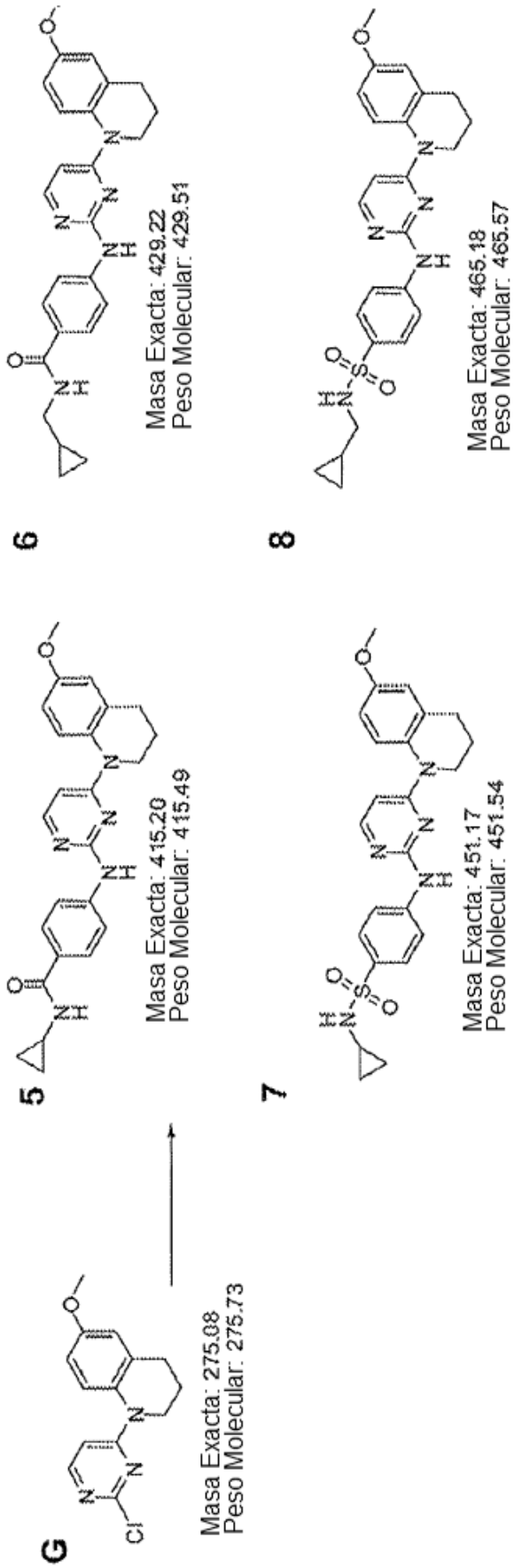


Figura 6N

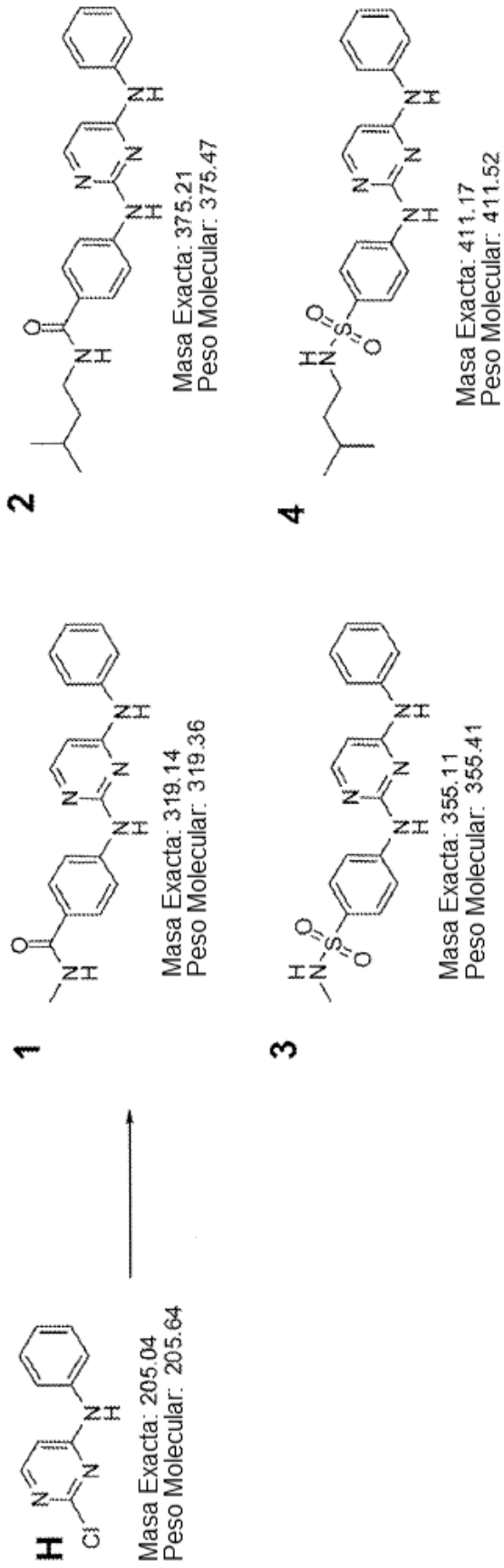
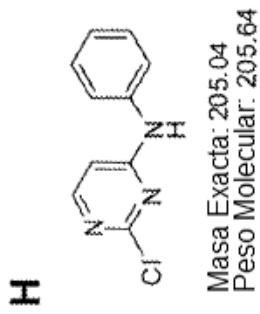
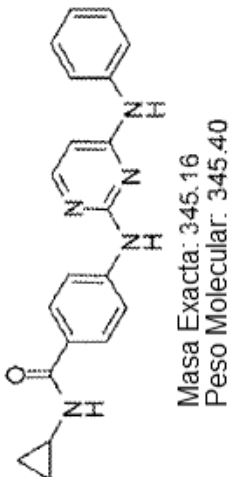


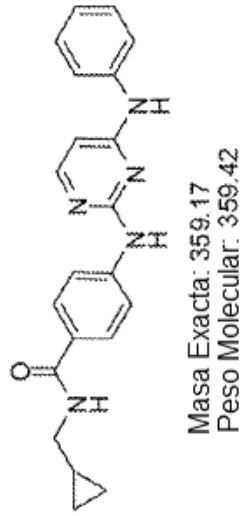
Figura 60



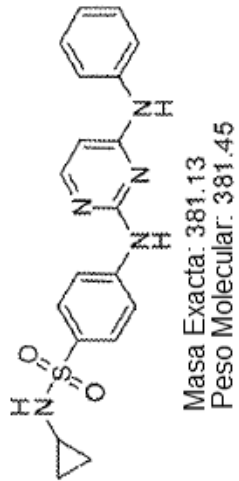
5



6



7



8

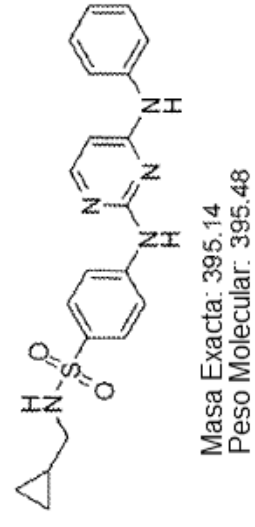


Figura 6P

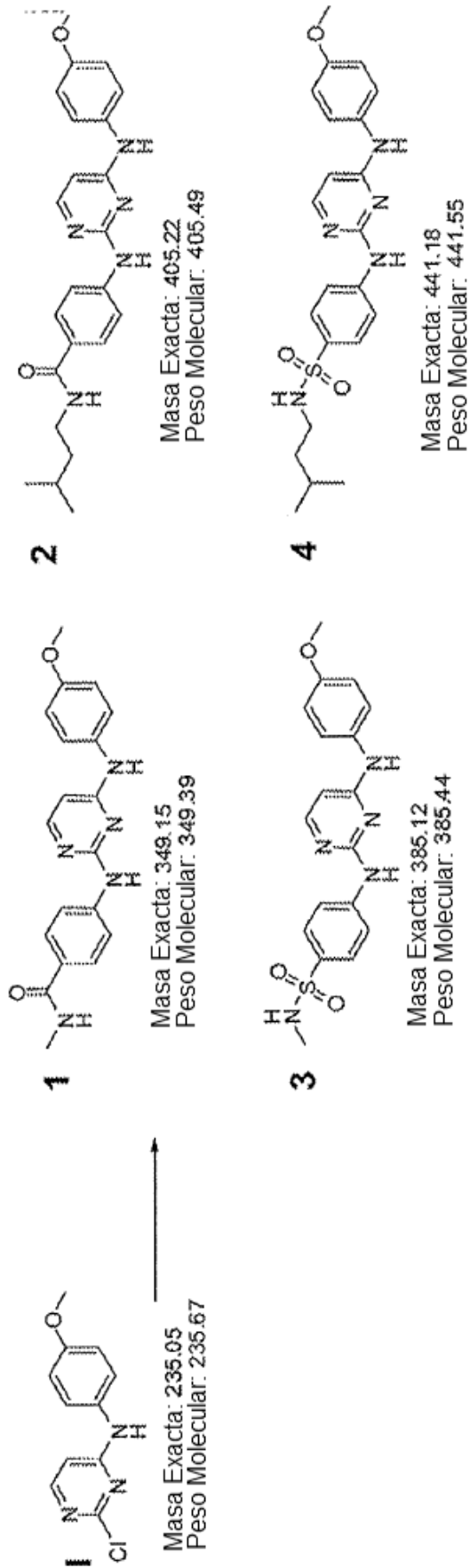


Figura 6Q

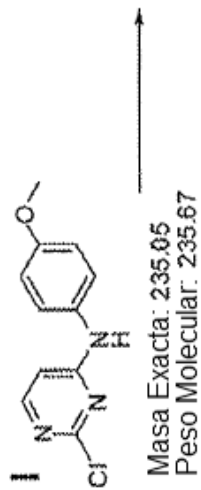
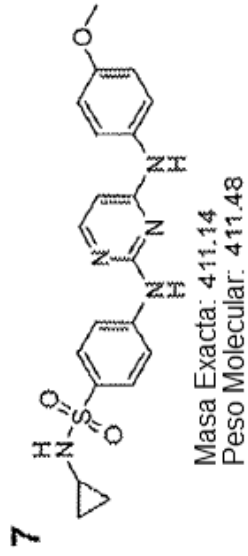
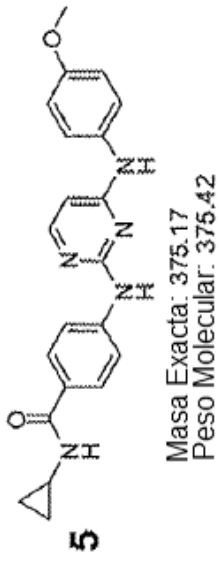
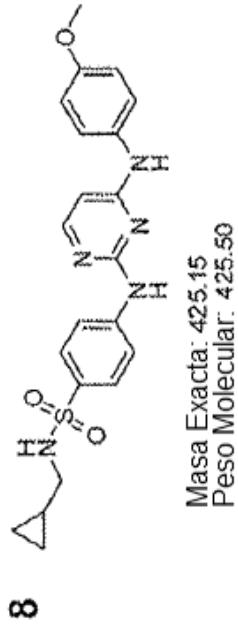
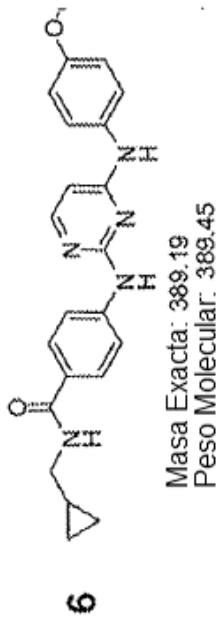


Figura 6R

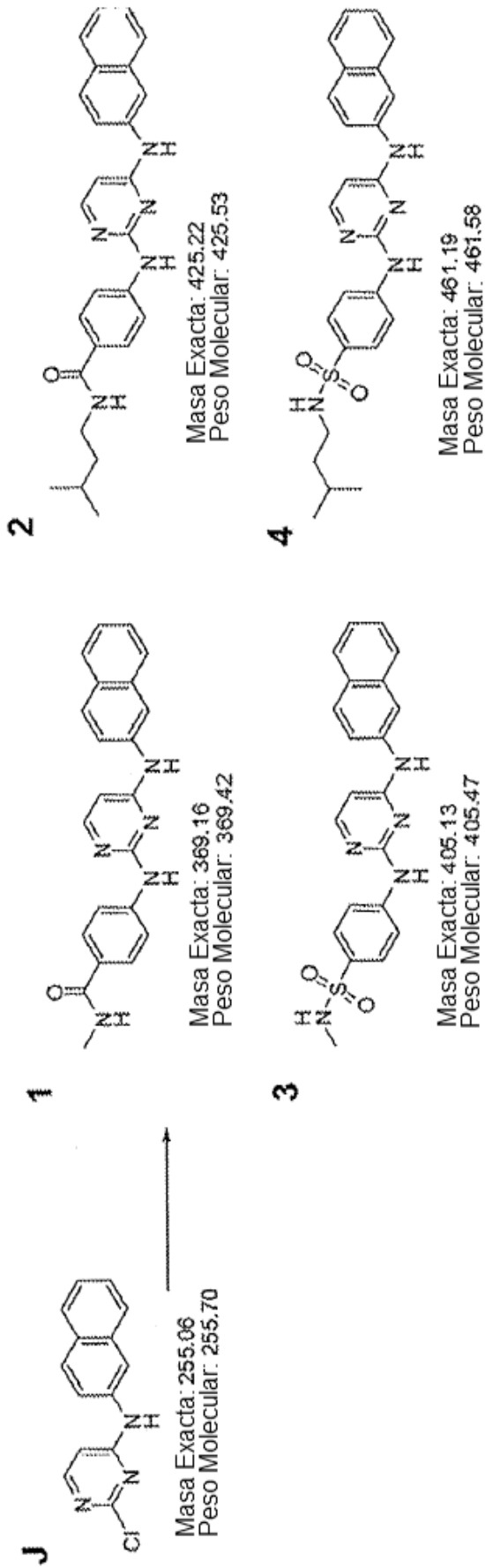


Figura 6S

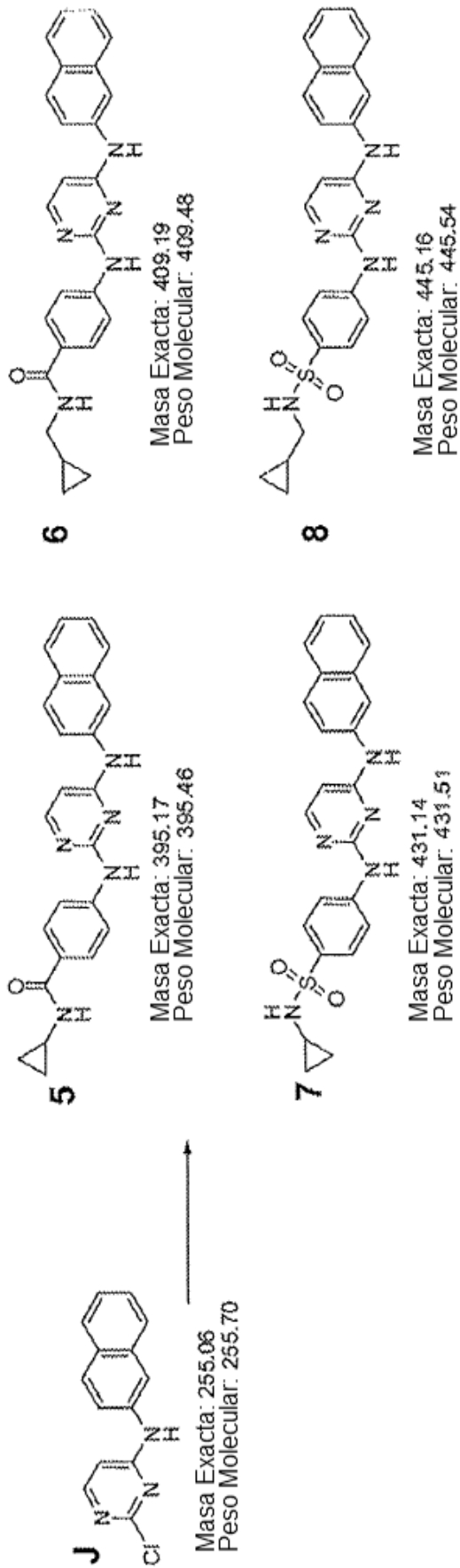


Figura 6T

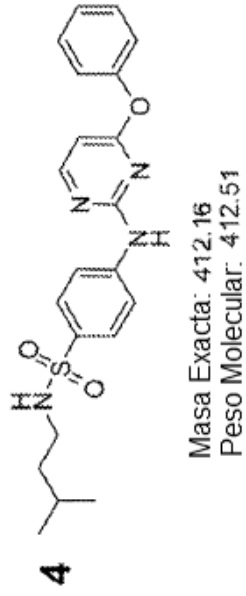
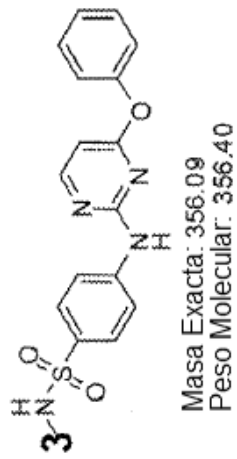
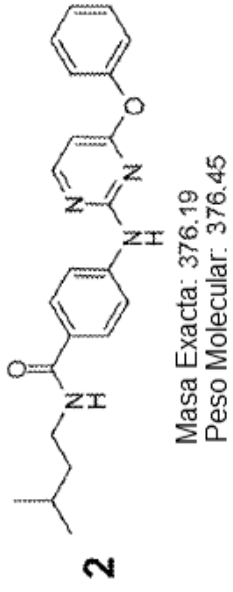
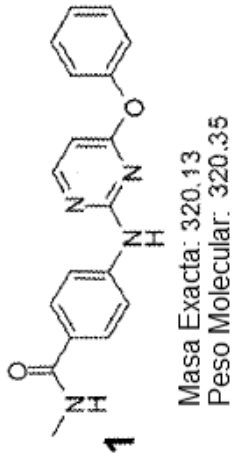
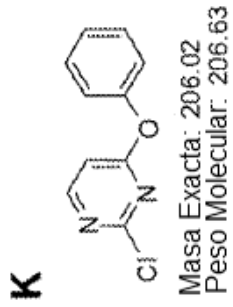


Figura 6U

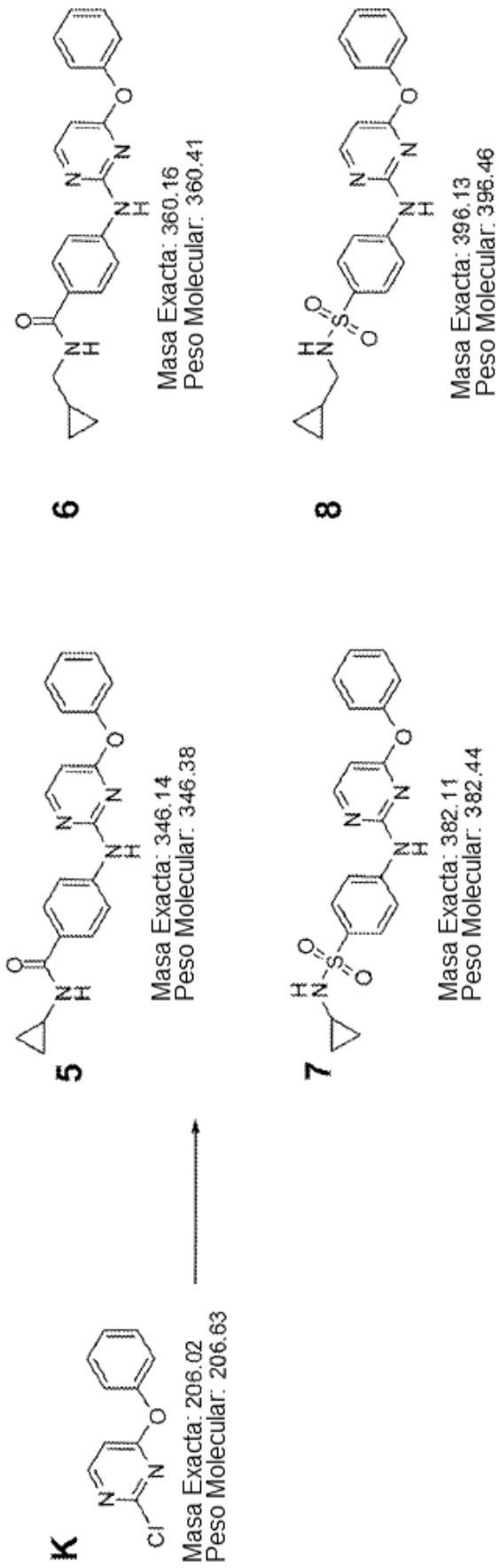


Figura 6V

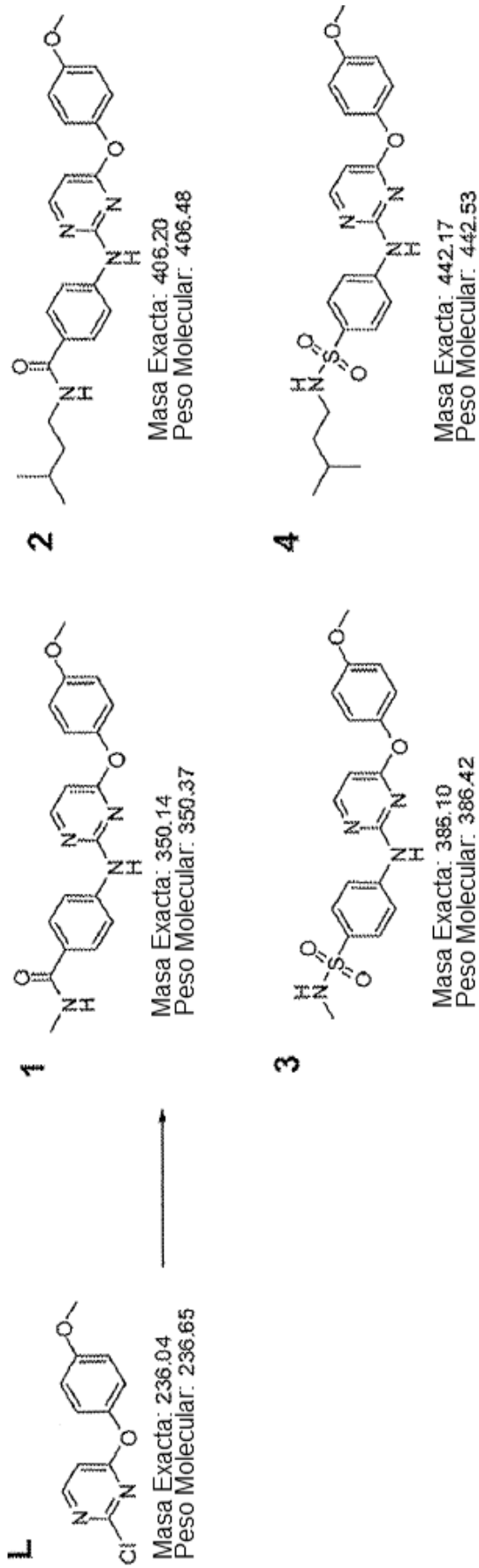


Figura 6W

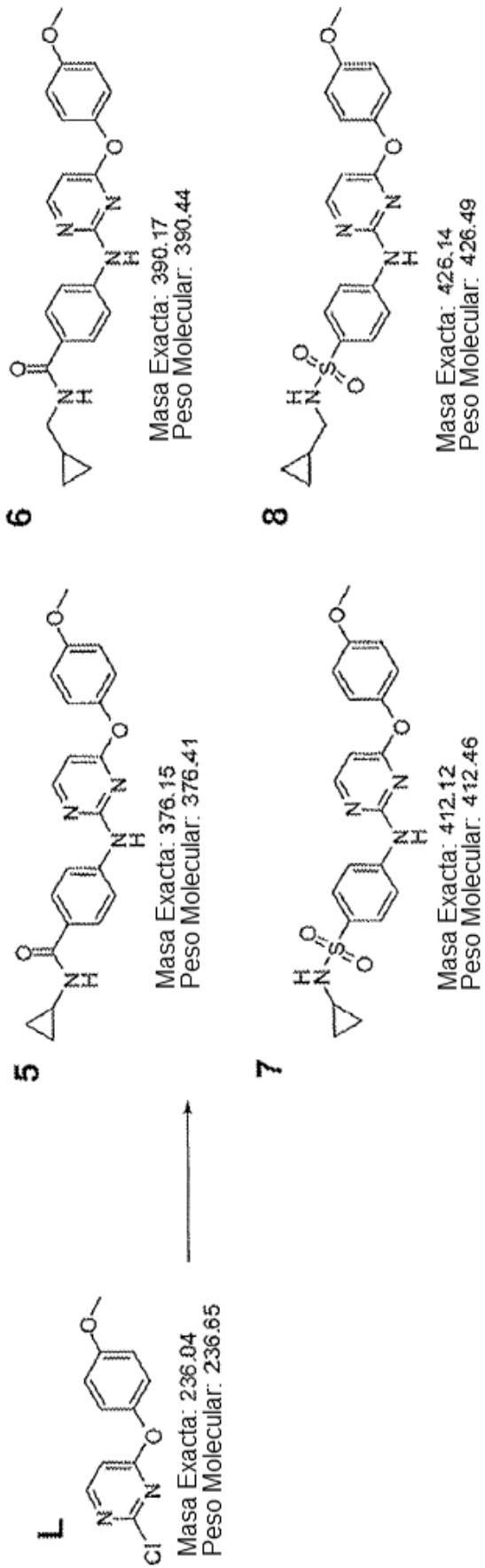


Figura 6X

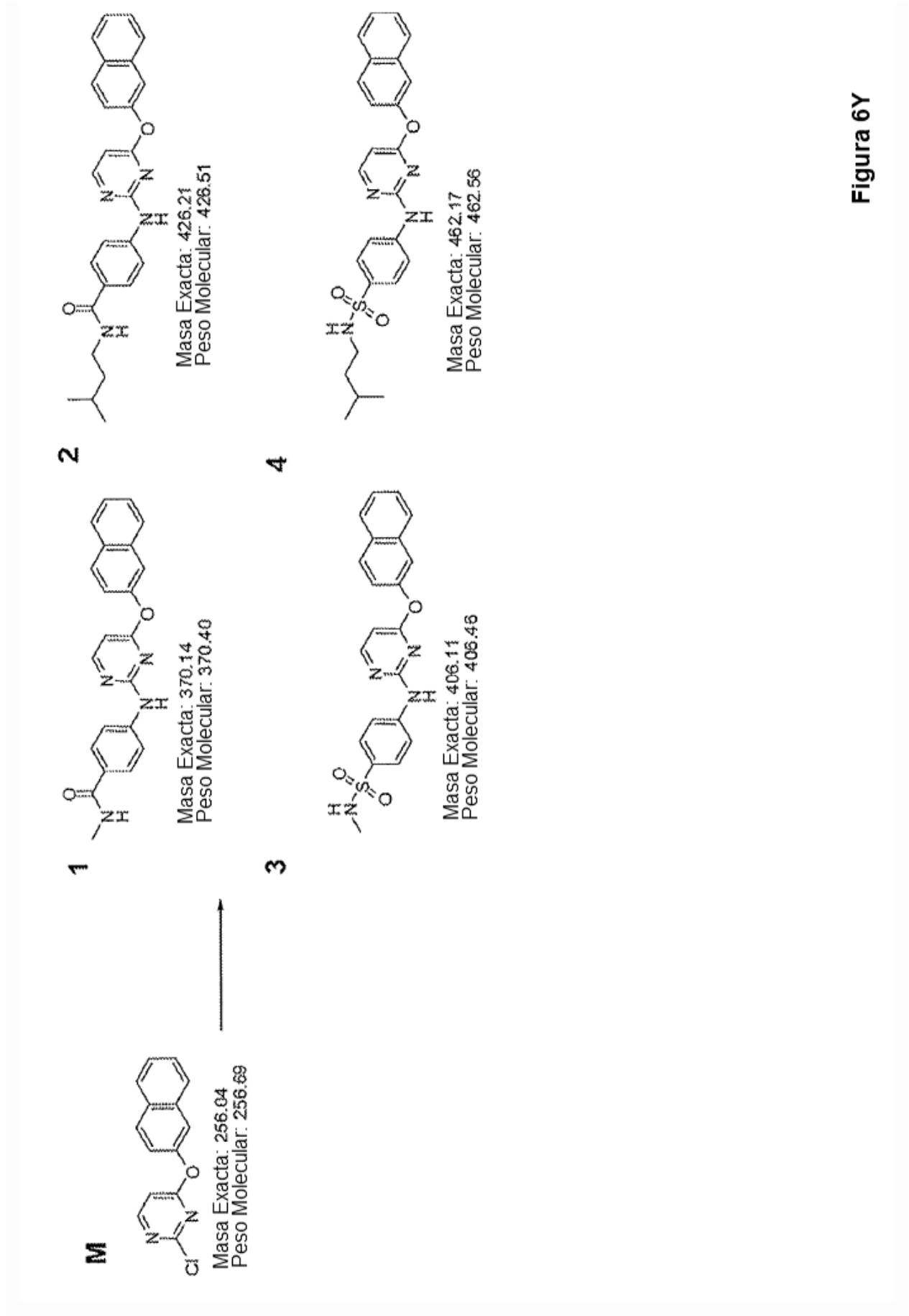


Figura 6Y

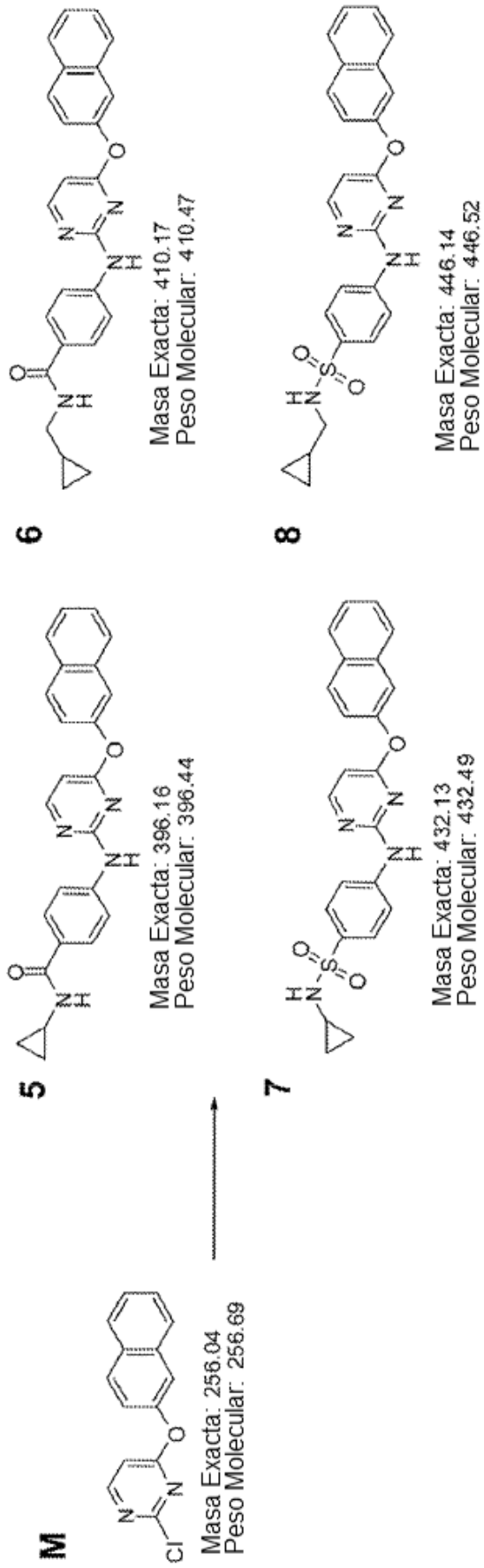


Figura 6Z

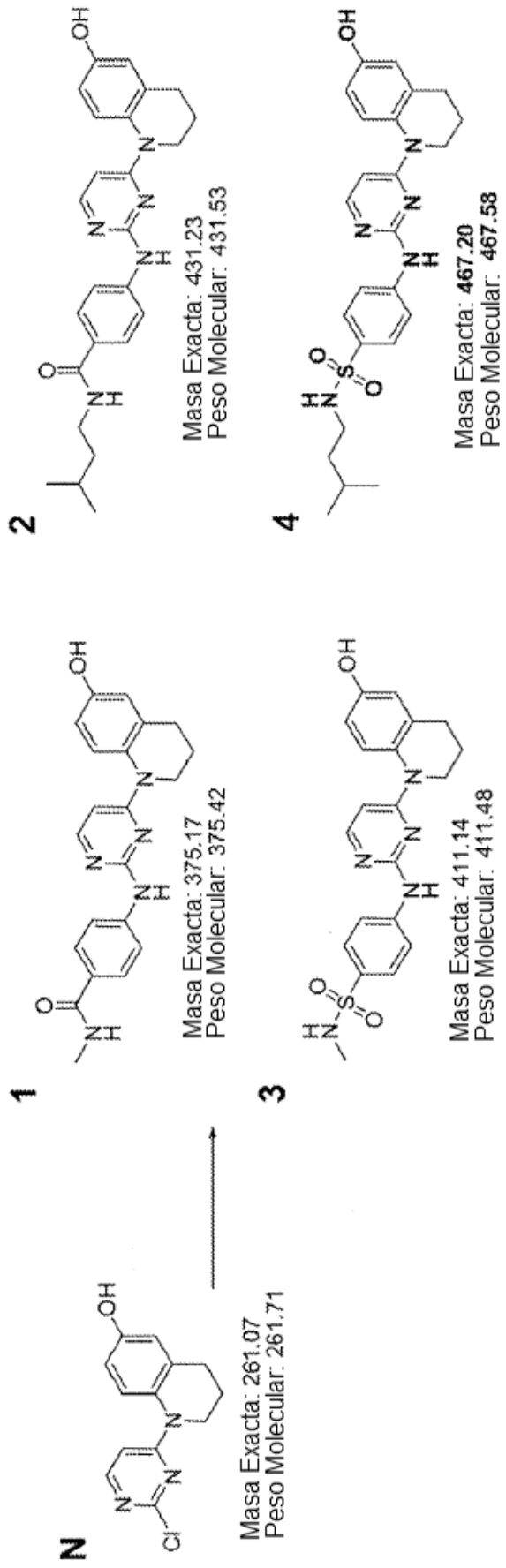


Figura 6AA

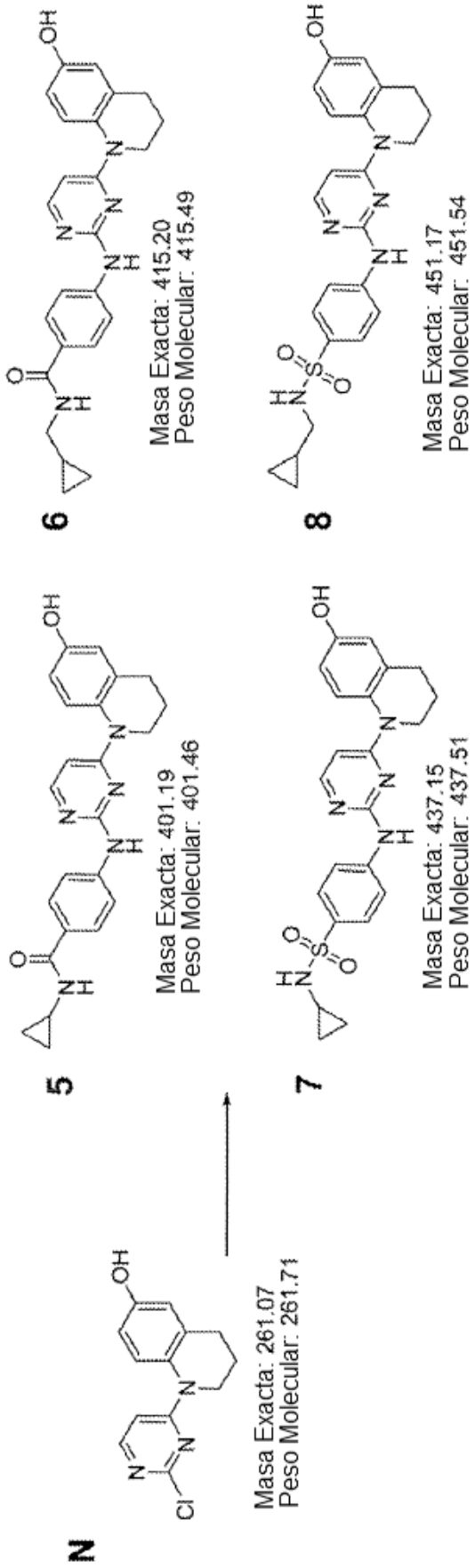


Figura 6AB

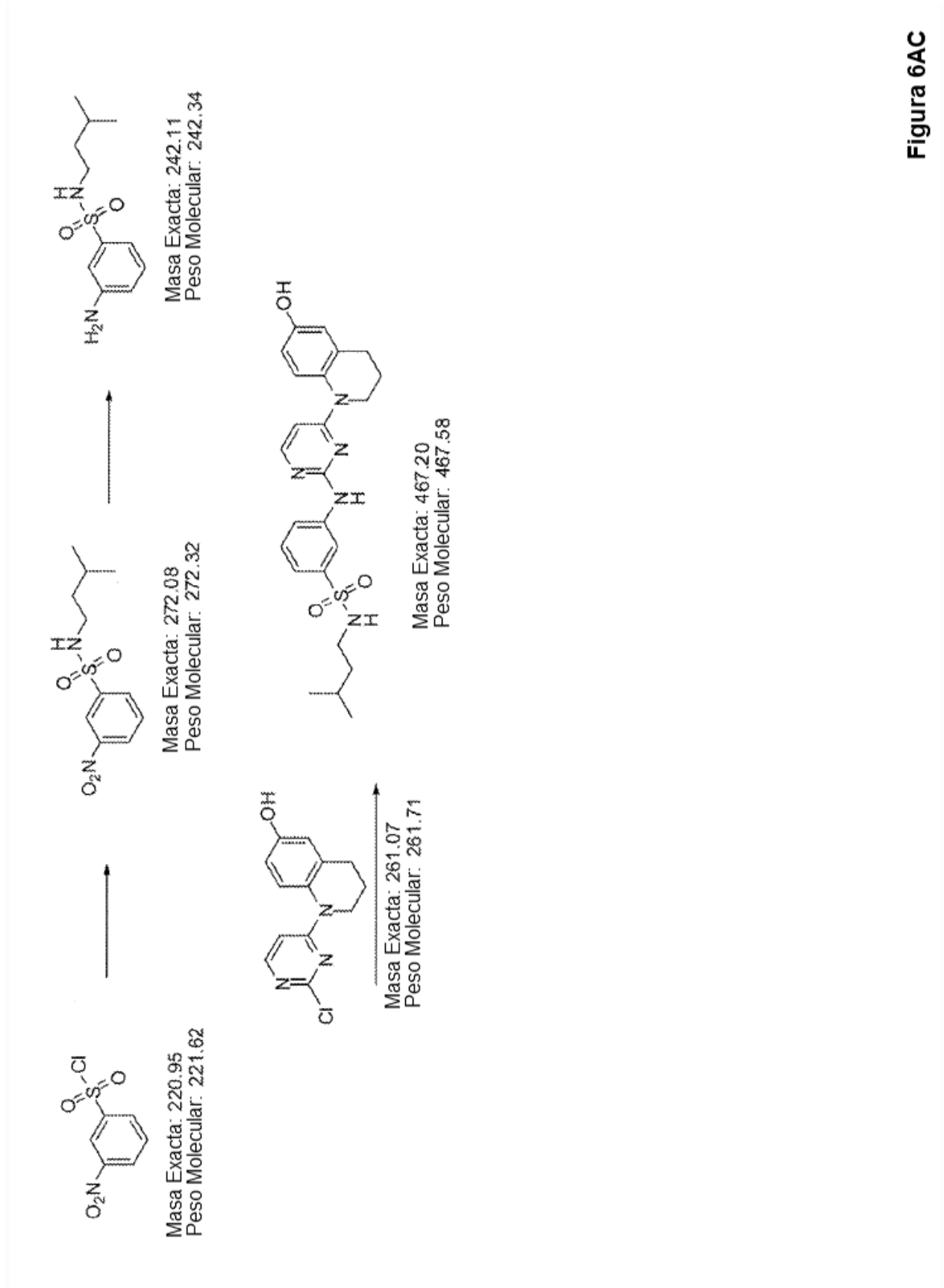


Figura 6AC