

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 946**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 7/00 (2006.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/CA2013/050052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13740815 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2807165**

54 Título: **Derivados de pirimido[4,5-b]indol y su uso en la expansión de células madre hematopoyéticas**

30 Prioridad:

27.01.2012 US 201261591521 P

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

03.12.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL (100.0%)
2900 Rue Edouard-Montpetit
Montréal, QC H3T 1J4, CA**

72 Inventor/es:

**SAUVAGEAU, GUY;
GAREAU, YVES;
RUEL, RÉJEAN;
GINGRAS, STÉPHANE y
FARES, IMAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 946 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

Derivados de pirimido[4,5-b]indol y su uso en la expansión de células madre hematopoyéticas

Referencia cruzada con solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad a la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/591.521, presentada el 27 de Enero de 2012.

Campo de la invención

La invención se refiere a derivados de pirimido[4,5-b]indol. También, la invención se refiere al uso de derivados de pirimido[4,5-b]indol para expandir células madre hematopoyéticas.

Antecedentes de la invención

10 Las principales fuentes de células madre hematopoyéticas (HSCs) son la sangre de médula ósea y del cordón umbilical (UCB). Las HSCs se usan en el ámbito de los trasplantes (autólogos o alogénicos) que constituyen una de las más eficaces estrategias de tratamientos para lograr curaciones en pacientes con neoplasias malignas hematológicas, afecciones de insuficiencia de la médula ósea, una variedad de enfermedades congénitas de interés mundial (por ejemplo, anemia de células falciformes y talasemia) y enfermedades autoinmunes tales como el lupus.
15 Sin embargo, esta oportunidad de tratamiento para salvar o mejorar la vida no está disponible para miles de personas en todo el mundo debido a la incapacidad de amplificar estas células *ex vivo* lo suficiente para que el procedimiento sea seguro y exitoso. Más concretamente, por cada 3 pacientes, uno perderá la oportunidad de trasplante porque no se puede encontrar un donante con idéntico antígeno leucocitario humano (HLA). Otra proporción de pacientes no tendrá acceso al trasplante simplemente porque hay muy pocas HSCs disponibles en el injerto (es decir, sangre de cordón umbilical o autólogo) para un trasplante exitoso. La seguridad y eficacia del trasplante de médula dependen directamente del número de HSCs y de células progenitoras disponibles para el injerto. Cuantas más se puedan infundir, más rápidamente se restaura la función hematológica y más corta es la ventana de riesgo de infección por falta de granulocitos o de sangrado por falta de plaquetas. El reto de proporcionar suficientes HSCs se intensifica aún más cuando se prefiere acondicionamiento no mieloablativo como en el contexto de la terapia génica para los principales trastornos de la sangre hereditarios (la principal causa genética de morbilidad y mortalidad en todo el mundo).

En adultos, las HSCs residen principalmente en la médula ósea y deben mobilizarse para entrar en la circulación antes de ser recogidas por aféresis, ya sea para trasplante autólogo o alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT). La recogida de un número adecuado de células CD34+, un marcador sustituto de (HSCs), es de suma importancia porque la dosis de células CD34+ influye en el éxito y la velocidad de recuperación hematopoyética. Varios informes sugieren que una dosis más alta de células CD34+ infundidas es independientemente predictiva de una supervivencia mejorada.

Los dos regímenes de movilización más utilizados son el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y la quimioterapia G-CSF plus. Plerixafor, un antagonista de CXCR4 aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en 2008 y 2011 por Health Canada, mejora la movilización de las HSCs cuando se administra con G-CSF. Sin embargo, Plerixafor está contraindicado en pacientes con leucemia debido a la movilización de células leucémicas. Se estima que la incapacidad para obtener un número suficiente de células CD34+/kg con los regímenes de movilización usados actualmente afecta hasta el 15% de los pacientes (varía según las enfermedades). El uso de HSCT autólogo en neoplasias malignas hematológicas a menudo está limitado por el hecho de que tanto las células madre normales como las cancerosas están presentes en la médula ósea, y por tanto es probable que se movilicen.

El HSCT alogénico con BM (médula ósea) o mPBSC (células madre de sangre periférica movilizadas) es otra alternativa de trasplante. Sin embargo, aproximadamente un tercio a un cuarto de los pacientes que son elegibles para este tipo de trasplante pueden no encontrar un donante adecuado. Para aquellos que se trasplantan, existe una alta frecuencia de mortalidad relacionada con el trasplante debido a la enfermedad de injerto contra el huésped, recaída o rechazo del injerto; y un riesgo de inmunodeficiencia durante periodos prolongados de tiempo. Alternativamente, la sangre del cordón umbilical se ha mostrado como una opción válida en el HSCT alogénico. Sin embargo, una sola unidad de CB (sangre del cordón umbilical) generalmente proporciona HSCs insuficientes para un paciente adulto para una recuperación hematopoyética rápida y eficaz.

50 Las condiciones *in vitro* que apoyan el mantenimiento a corto plazo mediado por citoquinas o incluso un aumento modesto en los números de HSCs en murinos o humanos medidos por ensayos de reconstitución en ratones, generalmente están acompañadas por un aumento mucho más fuerte en los posteriores tipos de poblaciones de células progenitoras. Más recientemente se han descrito aumentos más marcados en HSCs de murinos y humanos en cultivos que contienen otros factores tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulina, factores de crecimiento de tipo angiopoyetina y pleiotrofina. Sin embargo, estos últimos informes son hasta ahora solitarios y esperan confirmación independiente. Los aumentos a corto plazo

en las HSCs obtenidas con citoquinas estándar *in vitro* también son inevitablemente seguidos por una disminución eventual de las HSCs.

Las estrategias alternativas para la expansión de HSCs humanas han implicado su cultivo con elementos estromales o ligandos morfogénicos solubles (por ejemplo, estimulando las vías de Notch, Wnt y Hedgehog), la manipulación dirigida de vías de señalización intracelular específicas (inhibidores de PGE2, ROS, p38 y MAPK) o la manipulación de factores de transcripción específicos (por ejemplo, Hox, Hlf). Otros enfoques preclínicos para la expansión *ex vivo* de HSCs incluyen la incubación con: i) StemRegenin1 (SR1), un antagonista del receptor de hidrocarburos arílicos (Boitano, AE *et al.* "Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells" *Science* 329: 1345-1348. 2010); ii) Garcinol, un inhibidor de acetiltransferasas de histonas (Nishino, T *et al.* "Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by Garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase" *PLoS ONE* 6(9): e24298. 2011); y iii) NR-101, una pequeña molécula no peptídica agonista de c-MPL (Nishino *et al.* "Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL" *Exp. Hem.* 2009; 37:1364-1377). La caracterización de SR1 proporcionó una prueba de principio de que los compuestos de bajo peso molecular (LMW) tienen la capacidad de promover la expansión de las HSCs.

Los estudios clínicos han enfatizado el requisito no solo de la permanencia de los trasplantes administrados, sino también de la importancia de minimizar el tiempo hasta la aparición de niveles útiles de granulocitos después del trasplante, lo que a su vez depende del número de células infundidas repobladoras a corto plazo. El trasplante de células de la médula o del cordón umbilical expandidas en cultivo con citoquinas no ha demostrado hasta ahora una aceleración clínicamente útil de la recuperación hematopoyética en comparación con las células no tratadas. Los primeros resultados de los ensayos con células expandidas utilizando ligandos Notch inmovilizados han sido los primeros en mostrar una utilidad clínica potencial para cualquier (incluso modesta) estrategia de expansión de células progenitoras (Delaney *et al.* "Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution" *Nat. Med.* 16(2): 232-236. 2010). Sin embargo, este enfoque está limitado por la necesidad de usar una proteína de fusión Delta-1 inmovilizada durante la etapa de expansión *ex vivo* y por la falta de un efecto documentado en las células madre (el impacto parece estar limitado a progenitores más diferenciados). Otros enfoques en el ensayo clínico incluyen: i) StemEx, una combinación de células de UCB (sangre del cordón umbilical) cultivadas con el quelante de cobre tetraetilenpentamina (TEPA) y citoquinas, infundidas conjuntamente con células de UCB no tratadas; los resultados de la fase I muestran que el tiempo hasta el injerto de neutrófilos o plaquetas no mejoró en comparación con los informes anteriores (de Lima M *et al.* "Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial" *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41(9): 771-778); y 16-16 dimetil prostaglandina E2 (PGE2), que se usa para mejorar la dirección del UCBT en un ensayo de fase I.

Por tanto existe la necesidad de nuevas estrategias para aumentar la expansión de las células madre y progenitoras hematopoyéticas. Se conocen en la técnica ciertos derivados de pirimido[4,5-b]indol que se usan a este respecto; se describen por ejemplo en los documentos: WO 2003/037898; WO 2004/058764; WO 1998/042708; WO 1997/002266; WO 2000/066585; WO 1993/020078; WO 2006/116733; WO 2008/055233; WO 2010/006032; WO 1995/019970; WO 2005/037825; y WO 2009/004329.

El documento WO 2010/059401 describe compuestos heterocíclicos bicíclicos, tales como compuestos de piridilo sustituido, pirrolo[2,3-d]pirimidinilo, pirazolo[3,4-d]pirimidinilo e imidazo[4,5-c]piridinilo, para expandir el número de células CD34+ para trasplante autólogo o alogénico en pacientes con enfermedades inmunodeficientes y autoinmunes heredadas, así como diversos trastornos hematopoyéticos.

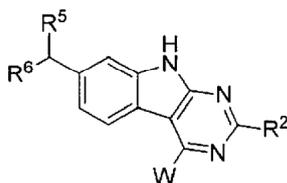
El documento WO2011/056739 describe compuestos tricíclicos de pirimido-indol-4il-amino-bencenosulfonamida, tetrahidro-pirimido-indol-4il-amino-bencenosulfonamida y tetrahidro-pirido-pirrolo-pirimidin-4il amino-bencenosulfonamida, que inhiben la quinasa que interacciona con troponina I (TNNI3K), una proteína quinasa que muestra una expresión altamente selectiva para los tejidos cardíacos.

El documento WO2009/004329 describe compuestos tricíclicos, especialmente compuestos de 9H-pirimido[4,5-b]indol, 9H-pirido[4',3':4,5]pirrolo[2,3-d]piridina, y 9H-1,3,6,9-tetraaza-fluoreno que inhiben la función quinásica de la quinasa 1 reguladora del ciclo celular (Checkpoint 1 (CHK1)). Los compuestos se usan en el tratamiento de enfermedades y afecciones que están mediadas por CHK1.

Sin embargo, estos documentos no describen los derivados de pirimido[4,5-b]indol según la invención o su uso en la expansión de células madre hematopoyéticas y células progenitoras.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: El compuesto 1 no actúa a través de la vía de los aril hidrocarburos (AhR). Se cultivaron células CD34(+) de sangre periférica movilizadas durante 12 horas con DMSO, SR1 [antagonista de AhR 1000 nM], y el compuesto 1 [500 nM], se recolectaron las células y se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real para los genes sensibles a AhR (CYP1B1 y AhRR). El compuesto 1, a diferencia de SR1, no suprime genes diana de aguas abajo de AhR, lo que sugiere que su función es independiente de la vía de AhR.



IIC

Los sustituyentes en las anteriores fórmulas generales IIA, IIB y IIC, a saber, W, R¹, R² y Het son como se definen en la presente memoria más adelante.

- 5 Según un aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula general IIA, IIB o IIC.

Según un aspecto, la invención describe el uso de un compuesto de fórmula general IIA, IIB o IIC para expandir células madre hematopoyéticas. En realizaciones de la invención, las células madre hematopoyéticas son células humanas.

- 10 Según un aspecto, la invención proporciona un método para aumentar las células madre hematopoyéticas o células progenitoras, comprendiendo el método cultivar *in vitro* o *ex vivo* una población de células de partida en presencia de un compuesto de fórmula general IIA, IIB o IIC. También, en realizaciones de la invención, la población de células de partida comprende células CD34+ extraídas de sangre periférica movilizada (mPB), médula ósea (BM) o sangre del cordón umbilical (UCB). Además, en realizaciones del método según la invención, opcionalmente, el cultivo de la población de células de partida en presencia de un compuesto de fórmula general IIA, IIB o IIC se realiza junto con al menos un factor de expansión celular que es una molécula biológica u otra molécula pequeña.

- 15 Según un aspecto, la invención describe una población celular expandida según el método de la invención, más específicamente, una población celular expandida usando un compuesto según la invención. En realizaciones, la invención describe células madre hematopoyéticas expandidas según el método de la invención, más específicamente, células madre hematopoyéticas expandidas usando un compuesto según la invención.

- 20 Según un aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula general IIA, IIB o IIC para usar en el tratamiento de un trastorno/neoplasia maligna hematopoyética, una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inmunodeficiente hereditaria en un sujeto.

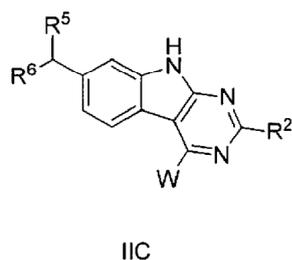
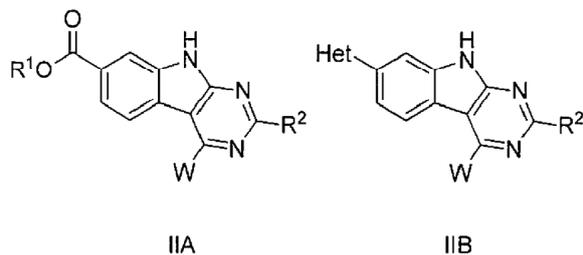
- 25 En realizaciones de la invención, el trastorno/neoplasia maligna hematopoyética, la enfermedad autoinmune y/o la enfermedad inmunodeficiente hereditaria comprenden afecciones de insuficiencia de la médula ósea, una variedad de enfermedades congénitas de preocupación mundial (por ejemplo, anemia de células falciformes y talasemia), lupus, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, trastornos mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, anemia aplásica, aplasia pura de células rojas, hemoglobinuria, anemia de Fanconi, talasemia, anemia de células falciformes, síndrome de Wiskott-Aldrich, errores congénitos del metabolismo (como la enfermedad de Gaucher, entre otras).

- 30 Según un aspecto, la invención proporciona un estuche para usar en células madre crecientes o progenitoras o en células madre hematopoyéticas en expansión, comprendiendo el estuche un compuesto de fórmula general IIA, IIB o IIC, e instrucciones de uso. En realizaciones de la invención, el estuche comprende al menos un factor de expansión celular que es una molécula biológica u otra pequeña.

Descripción detallada de la invención

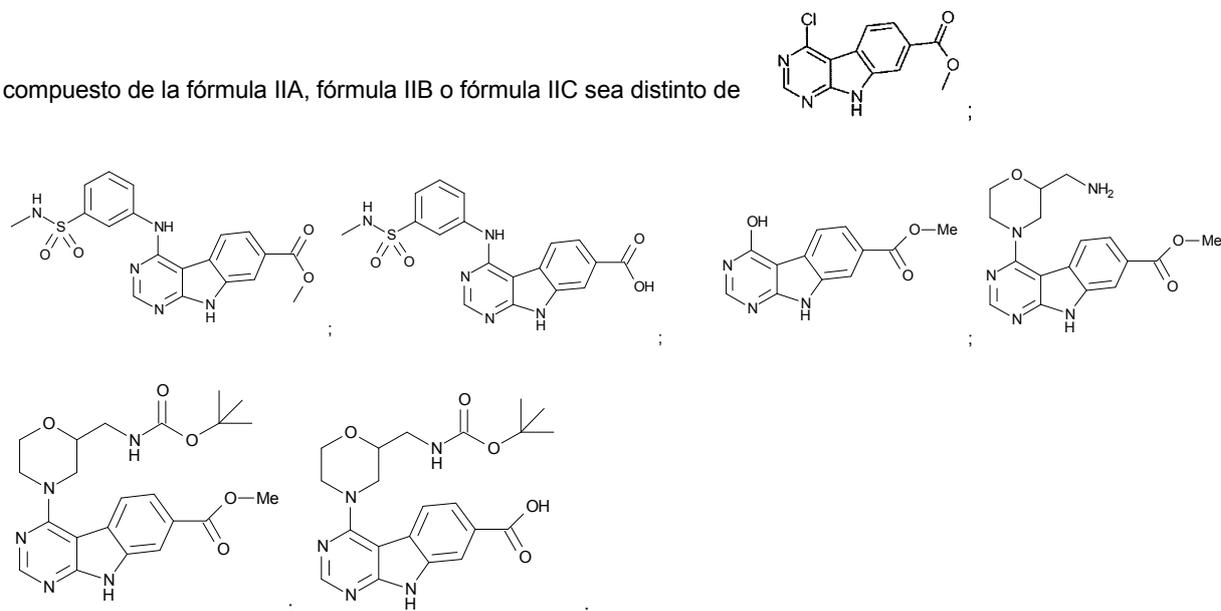
- 40 Los inventores han descubierto ciertos derivados de pirimido[4,5-b]indol. Estos compuestos son útiles para expandir poblaciones de células madre hematopoyéticas, en particular poblaciones de células madre hematopoyéticas humanas. Los compuestos también son útiles en el tratamiento médico de enfermedades que involucran células madre hematopoyéticas.

Los compuestos según la invención tienen la fórmula general IIA, IIB o IIC mostrada a continuación. Las sales de tales compuestos también están dentro del alcance de los compuestos según la invención.



En las fórmulas IIA, IIB y IIC, los sustituyentes se definen como se describe a continuación, siempre y cuando el

compuesto de la fórmula IIA, fórmula IIB o fórmula IIC sea distinto de



- Más específicamente, W es 74) $-(N(R^1)-L)_n - N(R^1)R^1$, o W es 1) -H, 2) -halógeno, 3) $-OR^1$, 4) $-L-OH$, 5) $-L-OR^1$, 6) $-SR^1$, 7) $-CN$, 8) $-P(O)(OR^1)(OR^1)$, 9) $-NHR^1$, 10) $-N(R^1)R^1$, 11) $-L-NH_2$, 12) $-L-NHR^1$, 13) $-L-N(R^1)R^1$, 14) $-L-SR^1$, 15) $-L-S(O)R^1$, 16) $-L-S(O)_2R^1$, 17) $-L-P(O)(OR^1)(OR^1)$, 18) $-C(O)R^1$, 19) $-C(O)NH_2$, 20) $-C(O)NHR^1$, 21) $-C(O)N(R^1)R^1$, 22) $-NHC(O)R^1$, 23) $-NR^1C(O)R^1$, 24) $-NHC(O)R^1$, 25) $-NR^1C(O)R^1$, 26) $-OC(O)NH_2$, 27) $-OC(O)NHR^1$, 28) $-OC(O)N(R^1)R^1$, 29) $-OC(O)R^1$, 30) $-C(O)R^1$, 31) $-NHC(O)NH_2$, 32) $-NHC(O)NHR^1$, 33) $-NHC(O)N(R^1)R^1$, 34) $-NR^1C(O)NH_2$, 35) $-NR^1C(O)NHR^1$, 36) $-NR^1C(O)N(R^1)R^1$, 37) $-NHS(O)_2R^1$, 38) $-NR^1S(O)_2R^1$, 39) $-S(O)_2NH_2$, 40) $-S(O)_2NHR^1$, 41) $-S(O)_2N(R^1)R^1$, 42) $-S(O)R^1$, 43) $-S(O)_2R^1$, 44) $-OS(O)_2R^1$, 45) $-S(O)_2OR^1$, 46) -bencilo opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes R^A ó R^1 , 47) $-L$ -heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A ó R^1 unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heteroarilo, 48) $-L$ -heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A ó R^1 unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo, 49) $-L$ -arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A ó R^1 unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo, 50) $-L-NR^1(R^1)$, 51) $-L$ - $_2 NR^1$, 52) $-L-(N(R^1)-L)_n-N(R^1)R^1$, 53) $-L-(N(R^1)-L)_n$ -heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A ó R^1 unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y

heteroarilo, 54) -L-(N(R¹)-L)_n-heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo, 55) -L-(N(R¹)-L)_n - arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo, 56) -O-L-N(R¹)R¹, 57) -O-L-heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heteroarilo, 58) -O-L-heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo, 59) -O-L-arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo, 60) -O-L)₂-NR¹, 61) -O-L-(N(R¹)-L)_n - N(R¹)R¹, 62) -O-L-(N(R¹)-L)_n - heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heteroarilo, 63) -O-L-(N(R¹)-L)_n - heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo, 64) -O-L-(N(R¹)-L)_n - arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹, 65) -S-L-heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹, 66) -S-L- heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹, 67) -S-L-arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo, 68) -S-L)₂ NR¹, 69) -S-L-(N(R¹)-L)_n - N(R¹)R¹, 70) -S-L-(N(R¹)-L)_n - heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A, 71) -S-L-(N(R¹)-L)_n -heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A, 72) -S-L-(N(R¹)-L)_n -arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A, 73) -NR¹(R¹), 75) -N(R¹)L)₂ -NR¹, 76) -(N(R¹)-L)_n -N(R¹)R^A, 77) -(N(R¹)-L)_n-heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹, 78)-(N(R¹)-L)_n-heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹, 79) -(N(R¹)-L)_n - arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹, 80) -heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A, o 81) -arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A. En esta lista, cada sustituyente se une opcionalmente al grupo L si no está ya presente; y cuando dos sustituyentes R¹ están presentes en el mismo átomo de nitrógeno, entonces cada sustituyente R¹ se selecciona independientemente de la lista de valores R¹ que se describe a continuación; y n es un número entero igual a 0, 1, 2, 3, 4, ó 5; y cuando (R¹) y R¹ se unen a un átomo de nitrógeno, opcionalmente se unen conjuntamente con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que opcionalmente incluye uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S, opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más R¹ o R^A.

L es: 1) -alquilo(C₁-C₆) o 4) -cicloalquilo(C₃-C₇), o L es 2) -alquenilo(C₂-C₆), 3) -alquinilo(C₂-C₆), 5) -cicloalquenilo(C₃-C₇), 6) heterociclilo, 7) -alquil(C₁-C₆)-cicloalquilo(C₃-C₇), 8) -alquil(C₁-C₆)-heterociclilo, 9) arilo, o 10) heteroarilo. En esta lista, los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituyen cada uno opcionalmente independientemente con uno o dos sustituyentes R^A.

R¹ es: 1) -H, 2) -alquilo(C₁-C₆), 3) -alquenilo(C₂-C₆), 4) -alquinilo(C₂-C₆), 5) -cicloalquilo(C₃-C₇), 6) -cicloalquenilo(C₃-C₇), 7) -(C₁-C₅) perfluorado, 8) -heterociclilo, 9) -arilo, 10) -heteroarilo, 11) -bencilo, o 12) 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]pentanoílo. En esta lista, los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquenilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo se sustituyen cada uno opcionalmente independientemente con 1, 2 ó 3 sustituyentes R^A o R¹.

R² es: 7) -bencilo opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes R^A o R¹ o 1) -H, o R² es: 2) -alquilo(C₁-C₆), 3) -SR¹, 4) -C(O)R¹, 5) -S(O)R¹, 6) -S(O)₂R¹, 8) -L-heteroarilo opcionalmente sustituido con un o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera o ambos grupos L y heteroarilo, 9) -L-heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera o ambos grupos L y heterociclilo, 10) -L-arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera o ambos grupos L y arilo, 11) -heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹, o 12) -arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹. En esta lista, cada sustituyente opcionalmente se une al grupo L si no está ya presente.

R^A es: 1) -halógeno, 2) -CF₃, 3) -OH, 4) -OR¹, 5) -L-OH, 6) -L-OR¹, 7) -OCF₃, 8) -SH, 9) -SR¹, 10) -CN, 11) -NO₂, 12) -NH₂, 13) -NHR¹, 14) -NR¹R¹, 15) -L-NH₂, 16) -L-NHR¹, 17) -L-NR⁴R¹, 18) -L-SR¹, 19) -L-S(O)R¹, 20) -L-S(O)₂R¹, 21) -C(O)OH, 22) -C(O)OR¹, 23) -C(O)NH₂, 24) -C(O)NHR¹, 25) -C(O)N(R¹)R¹, 26) -NHC(O)R¹, 27) -NR¹C(O)R¹, 28) -NHC(O)OR¹, 29) -NR¹C(O)OR¹, 30) -OC(O)NH₂, 31) -OC(O)NHR¹, 32) -OC(O)N(R¹)R¹, 33) -OC(O)R¹, 34) -C(O)R¹, 35) -NHC(O)NH₂, 36) -NHC(O)NHR¹, 37) -NHC(O)N(R¹)R¹, 38) -NR¹C(O)NH₂, 39) -NR¹C(O)NHR¹, 40) -NR¹C(O)N(R¹)R¹, 41) -NHS(O)₂R¹, 42) -NR¹S(O)₂R¹, 43) -S(O)₂NH₂, 44) -S(O)₂NHR¹, 45) -S(O)₂N(R¹)R¹, 46) -S(O)R¹, 47) -S(O)₂R¹, 48) -OS(O)₂R¹, 49) -S(O)₂OR¹, 50) -bencilo, 51) -N₃, o 52) -C(-N=N-)(CF₃). En esta lista, el grupo bencilo está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes R^A o R¹.

En los compuestos de la anterior fórmula general IIB, Het es un heterociclo de 3 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con uno o más R¹ o R^A como se han definido anteriormente en la presente memoria.

En los compuestos de la fórmula general IIC anterior R⁵ y R⁶ son iguales o diferentes y son cada uno independientemente L como se ha definido anteriormente en la presente memoria, o se unen conjuntamente con C para formar un anillo de 5 miembros que opcionalmente incluye uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más R¹ o R^A. En realizaciones adicionales, el anillo es un anillo de 5 miembros y el heteroátomo es un átomo de nitrógeno. En más realizaciones adicionales, el anillo incluye cuatro átomos de nitrógeno. En más realizaciones adicionales, R² es bencilo.

En realizaciones de la invención, los compuestos de la invención son los compuestos No. 1 a 55 representados en la Tabla 1 más adelante en la presente memoria. Las sales de tales compuestos están también dentro del alcance de los compuestos según la invención.

5 En realizaciones adicionales de la invención, los compuestos tienen las fórmulas representadas en la Tabla 1 más adelante en la presente memoria. Las sales de tales compuestos están también dentro del alcance de los compuestos según la invención.

Definiciones:

A menos que se especifique de otro modo, se aplican las siguientes definiciones:

10 Las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen las correspondientes referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "que comprende" pretende significar que la lista de elementos siguientes a la expresión "que comprende" es necesaria u obligatoria, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar o no presentes.

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "que consiste en" pretende significar que incluye y está limitada a lo que sigue a la frase "que consiste en". Por tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios y que ningunos otros elementos pueden estar presentes.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" pretende incluir grupos hidrocarbonados alifáticos saturados tanto de cadena lineal como ramificada que tienen el número especificado de átomos de carbono, por ejemplo, C₁-C₆ en alquilo(C₁-C₆) se define como que incluye grupos que tienen 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 carbonos en una estructura saturada lineal o ramificada. Los ejemplos de alquilo(C₁-C₆) como se ha definido anteriormente incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, i-butilo, pentilo, y hexilo.

25 Como se usa en la presente memoria, el término "cicloalquilo" pretende significar un grupo hidrocarbonado alifático saturado monocíclico que tiene el número especificado de átomos de carbono en él, por ejemplo C₃-C₇ en cicloalquilo(C₃-C₇) se define como que incluye grupos que tienen 3, 4, 5, 6 ó 7 carbonos en una estructura saturada monocíclica. Los ejemplos de cicloalquilo(C₃-C₇) como se ha definido anteriormente incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "alqueno" pretende significar grupos hidrocarbonados insaturados de cadena lineal o ramificada que tienen el número especificado de átomos de carbono en ellos, y en los que al menos dos de los átomos de carbono están enlazados entre sí mediante un doble enlace, y que tienen una regioquímica E o Z y sus combinaciones. Por ejemplo, C₂-C₆ en alqueno(C₂-C₆) se define como que incluye grupos que tienen 2, 3, 4, 5 ó 6 carbonos en una estructura lineal o ramificada, estando al menos dos de los átomos de carbono enlazados entre sí mediante un doble enlace. Los ejemplos de alqueno(C₂-C₆) incluyen, pero no se limitan a, etenilo (vinilo), 1-propeno, 2-propeno, 1-butenilo y similares.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "alquino" pretende significar grupos hidrocarbonados insaturados de cadena lineal que tienen el número especificado de átomos de carbono en ellos y en los que al menos dos átomos de carbono están enlazados entre sí mediante un triple enlace. Por ejemplo, alquino(C₂-C₄) se define como que incluye grupos que tienen 2, 3 ó 4 átomos de carbono en una cadena, estando al menos dos de los átomos de carbono enlazados entre sí mediante un triple enlace. Los ejemplos de dicho alquino incluyen, pero no se limitan a, etino, 1-propino, 2-propino y similares.

40 Como se usa en la presente memoria, el término "cicloalqueno" pretende significar un grupo hidrocarbonado alifático saturado monocíclico que tiene el número especificado de átomos de carbono en él, por ejemplo C₃-C₇ en cicloalqueno(C₃-C₇) se define como que incluye grupos que tienen 3, 4, 5, 6 ó 7 carbonos en una estructura monocíclica. Los ejemplos de cicloalqueno(C₃-C₇) como se ha definido anteriormente incluyen, pero no se limitan a, ciclopropeno, ciclohexeno y similares.

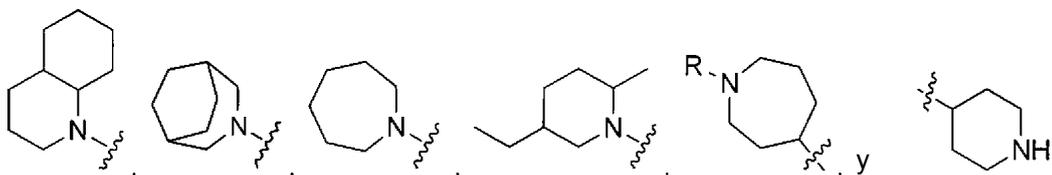
45 Como se usa en la presente memoria, el término "halo" o "halógeno" pretende significar flúor, cloro, bromo o yodo.

Como se usa en la presente memoria, el término "haloalquilo" pretende significar un alquilo como se ha definido anteriormente, en el que cada átomo de hidrógeno puede ser reemplazado sucesivamente por un átomo de halógeno. Los ejemplos de haloalquilo incluyen, pero no se limitan a, CH₂F, CHF₂ y CF₃.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "arilo", ya sea solo o en combinación con otro radical, significa un grupo monocíclico aromático carbocíclico que contiene 6 átomos de carbono que además puede estar fusionado con un segundo grupo carbocíclico de 5 ó 6 miembros que puede ser aromático, saturado o insaturado. Los ejemplos de arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, indanilo, 1-naftilo, 2-naftilo, tetrahidronaftilo y similares. El arilo puede estar conectado a otro grupo en una posición adecuada sobre el anillo de cicloalquilo o el anillo aromático.

Como se usa en la presente memoria, el término "heteroarilo" pretende significar un sistema anular monocíclico o bicíclico de hasta 10 átomos, en donde al menos un anillo es aromático, y contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N, y S. El heteroarilo puede estar unido a través de un átomo de carbono de anillo o uno de los heteroátomos. Los ejemplos de heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, tienilo, benzimidazolilo, benzo[b]tienilo, furilo, benzofuranilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolilo, indazolilo, purínilo, 4H-quinolizínilo, isoquinolilo, quinolilo, ftalazinilo, naptiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, isotiazolilo, isocromanilo, cromanilo, isoxazolilo, furazanilo, indolinilo, isoindolinilo, tiazolo[4,5-b]-piridina, tetrazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tienilo y derivados de la fluoresceína.

Como se usa en la presente memoria, el término "heterociclo", "heterocíclico" o "heterociclilo" pretende significar un sistema anular no aromático de 3, 4, 5, 6, ó 7 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S. Los ejemplos de heterociclos incluyen, pero no se limitan a, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, piperidilo, 3,5-dimetilpiperidilo, pirrolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, y similares, en donde la unión al anillo puede ser sobre el átomo de nitrógeno o un átomo de carbono del anillo tal como se describe de aquí en adelante:



Como se usa en la presente memoria, la expresión "opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes" o su expresión equivalente "opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente" pretende significar que el caso de circunstancias posteriormente descrito puede ocurrir o no, y que la descripción incluye ejemplos en que el caso o circunstancia ocurre y ejemplos en que no. La definición pretende significar de cero a cinco sustituyentes.

Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" o "paciente" pretende significar mamíferos humanos y no humanos tales como primates, gatos, perros, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos, conejos, ratas, ratones y similares.

Si los mismos sustituyentes son incompatibles con los métodos sintéticos descritos en la presente memoria, el sustituyente puede protegerse con un grupo protector adecuado (PG) que sea estable en las condiciones de reacción usadas en estos métodos. El grupo protector puede separarse en un punto adecuado en la secuencia de reacciones del método para proporcionar un compuesto intermedio o compuesto diana deseado. Grupos protectores adecuados y los métodos para proteger y desproteger diferentes sustituyentes usando dichos grupos protectores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica; ejemplos de los cuales se pueden encontrar en T. Greene and P. Wuts, "Protecting Groups in Chemical Synthesis" (4th ed.), John Wiley & Sons, NY (2007). Los ejemplos de grupos protectores usados en todo incluyen, pero no se limitan a, Fmoc, Bn, Boc, CBz y COC₃. En algunos casos, se puede seleccionar específicamente un sustituyente para que sea reactivo en las condiciones de reacción usadas en los métodos descritos en la presente memoria. En estas circunstancias, las condiciones de reacción convierten el sustituyente seleccionado en otro sustituyente que es útil en un compuesto intermedio en los métodos descritos en la presente memoria o es un sustituyente deseado en un compuesto diana.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" pretende significar tanto sales de adición de ácido como de base.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable" pretende significar aquellas sales que conservan la efectividad biológica y propiedades de las bases libres, que no son biológicamente o de otro modo indeseadas, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico, y similares.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "sal de adición básica farmacéuticamente aceptable" pretende significar aquellas sales que conservan la efectividad biológica y propiedades de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otro modo indeseadas. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de las bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio, y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas naturales sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-

dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas poliamínicas y similares.

5 Los compuestos según la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más centros
 asimétricos, ejes quirales y planos quirales y por tanto pueden dar lugar a enantiómeros, diastereoisómeros, y otras
 formas estereoisómeras y pueden definirse en términos de estereoquímica absoluta, tal como (R)- o (S)- o, como
 (D)- o (L)- para los aminoácidos. La presente pretende incluir todos los isómeros posibles, así como sus formas
 10 racémicas y ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (+) y (-), (R)- y (S)-, o (D)- y (L)- se pueden
 preparar usando tintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver usando técnicas convencionales, tales
 como HPLC de fase reversa. Las mezclas racémicas se pueden preparar y posteriormente separar en isómeros
 ópticos individuales o estos isómeros ópticos se pueden preparar mediante síntesis quiral. Los enantiómeros se
 pueden resolver mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante la formación de
 sales diastereoisómeras que después se pueden separar mediante cristalización, cromatografía gas-líquido o
 15 líquida, reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico de enantiómero. Los expertos en la técnica
 apreciarán también que cuando el enantiómero deseado se convierte en otra entidad química mediante una técnica
 de separación, se requiere entonces una etapa adicional para formar la forma enantiomérica deseada.
 Alternativamente, se pueden sintetizar enantiómeros específicos mediante síntesis asimétrica usando reactivos
 ópticamente activos, sustratos, catalizadores, o disolventes o mediante la conversión de un enantiómero en otro
 mediante transformación asimétrica.

20 Ciertos compuestos según la invención pueden existir como una mezcla de epímeros. Epímeros significa
 diastereoisómeros que tienen la configuración opuesta en solo uno de dos o más centros estereogénicos presentes
 en el compuesto respectivo.

Los compuestos según la invención pueden existir en forma zwitteriónica y la presente incluye formas zwitteriónicas
 de estos compuestos y sus mezclas.

25 Además, los compuestos según la invención pueden existir también en formas hidratadas y anhidras. Se incluyen los
 hidratos del compuesto de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente memoria. En una realización
 adicional, el compuesto según cualquiera de las fórmulas descritas en la presente memoria es un monohidrato. En
 realizaciones de la invención, los compuestos descritos en la presente memoria comprenden aproximadamente 10%
 o menos, aproximadamente 9 % o menos, aproximadamente 8% o menos, aproximadamente 7% o menos,
 30 aproximadamente 6% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente
 3% o menos, aproximadamente 2% o menos, aproximadamente 1% o menos, aproximadamente 0,5% o menos,
 aproximadamente 0,1% o menos en peso de agua. En otras realizaciones, los compuestos descritos en la presente
 memoria comprenden, aproximadamente 0,1% o más, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más,
 aproximadamente 2% o más, aproximadamente 3% o más, aproximadamente 4% o más, aproximadamente 5% o
 35 más, o aproximadamente 6% o más en peso de agua.

Como se usa en la presente memoria, el término "EC₅₀" pretende significar la concentración que da como resultado
 un aumento del 50% en el recuento de células CD34+CD45RA- en comparación con los cultivos de vehículo
 (DMSO).

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión "células madre hematopoyéticas" o "HSCs" pretende significar
 células que tienen tanto pluripotencia que les permite diferenciarse en células maduras funcionales tales como
 granulocitos (por ejemplo, promielocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), eritrocitos (por ejemplo, reticulocitos,
 eritrocitos), trombocitos (por ejemplo, megacarioblastos, megacariocitos que producen plaquetas, plaquetas), y
 monocitos (por ejemplo, monocitos, macrófagos), como la capacidad de regenerarse mientras se mantiene su
 pluripotencia (auto-renovación).

45 Las HSCs son parte de la población celular inicial. Estas células se obtienen opcionalmente del cuerpo o un órgano
 del cuerpo que contiene células de origen hematopoyético. Tales fuentes incluyen médula ósea no fraccionada,
 cordón umbilical, sangre periférica, hígado, timo, linfa y bazo. Todos los productos sanguíneos sin tratar o no
 fraccionados mencionados anteriormente se pueden enriquecer en células que tienen características de células
 madre hematopoyéticas en formas conocidas por los expertos en la técnica.

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "población celular de partida" pretende identificar una población
 celular que comprende HSCs recogidas de una o diversas fuentes mencionadas anteriormente, como se conoce en
 la técnica. La población celular de partida se puede enriquecer en células CD34+, lo que significa una población
 celular seleccionada sobre la base de la presencia del marcador de superficie celular CD34+. Las células CD34+
 pueden detectarse y contarse usando por ejemplo citometría de flujo y anticuerpos anti-CD34 marcados con
 55 fluorescencia. Además, la población celular de partida puede usarse directamente para expansión o congelarse y
 almacenarse para usar en un momento posterior.

Durante la hematopoyesis, las HSCs primero divergen en la etapa progenitora en el linaje mielóide y el linaje linfóide,
 después se diferencian en células madre mieloides (células formadoras de colonias mixtas, CFU-GEMM) y en

5 células madre linfoides, respectivamente. Además, las células madre mieloides se diferencian en eritrocitos a través de células formadoras de brotes eritroides (BFU-E) y células formadoras de colonias eritroides (CFU-E), en trombocitos a través de células formadoras de colonias megacariocíticas (CFU-MEG), en monocitos, neutrófilos y basófilos a través de células formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM), y en eosinófilos a través de células formadoras de colonias de eosinófilos (CFU-Eo), mientras que las células madre linfoides se diferencian en células T a través de células progenitoras linfoides T y en células B a través de células progenitoras linfoides B. Estas células madre mieloides y diversas células progenitoras hematopoyéticas derivadas de ellas se identifican por las propiedades de las colonias que forman en agar blando, medio de metilcelulosa semisólida o similar en presencia de diversas citoquinas.

10 La presente invención incluye también el uso de un compuesto según la invención y como se define en la presente memoria, o una sal del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto (o paciente) que padece de la siguiente lista no limitativa de trastornos: trasplante autólogo o alogénico o tratamiento de un sujeto (o paciente) que padece de los trastornos mencionados anteriormente o de trastornos autoinmunes. Los ejemplos de neoplasias malignas/trastornos hematológicos y enfermedades congénitas pueden incluir, sin limitación, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, trastornos mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, anemia aplásica, aplasia pura de células rojas, hemoglobinuria, anemia de Fanconi, talasemia, anemia de células falciformes, síndrome de Wiskott-Aldrich, errores congénitos del metabolismo (como la enfermedad de Gaucher, entre otras). Los ejemplos de trastornos inmunológicos que pueden beneficiarse del trasplante son numerosos e incluyen esclerosis múltiple, lupus, ciertas formas o artritis, inmunodeficiencias combinadas graves, y similares.

Por tanto, la presente invención abarca la administración, a un paciente que padece de cualquiera de los trastornos/neoplasias malignas mencionados anteriormente, de HSCs que se expanden usando un compuesto según la invención.

25 Además, los compuestos y composiciones que se describen son para usar en las siguientes situaciones no limitativas: trasplante autólogo o alogénico o tratamiento de un sujeto (o paciente) que padece de los trastornos mencionados anteriormente o de trastornos autoinmunes. Los ejemplos de neoplasias malignas/trastornos hematológicos y enfermedades congénitas pueden incluir, sin limitación, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, trastornos mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, anemia aplásica, aplasia pura de células rojas, hemoglobinuria, anemia de Fanconi, talasemia, anemia de células falciformes, síndrome de Wiskott-Aldrich, errores congénitos del metabolismo (como la enfermedad de Gaucher, entre otras). Los ejemplos de trastornos inmunológicos que pueden beneficiarse del trasplante son numerosos e incluyen esclerosis múltiple, lupus, ciertas formas o artritis, inmunodeficiencias combinadas graves, y similares.

35 Por tanto, la presente invención abarca la administración, a un paciente que padece de cualquiera de los trastornos/neoplasias malignas mencionados anteriormente, de HSCs que se expanden usando un compuesto según la invención.

40 También se describe en la presente invención una población celular obtenida después de la expansión usando el método según la invención y como se describe en la presente memoria. La expansión celular usando el método de la presente invención puede conducir a un aumento del número de células progenitoras que es útil en la aceleración del tiempo hasta el injerto de neutrófilos y plaquetas, por ejemplo. Tal método comprende: cultivar una población de partida que comprende HSCs con un agente capaz de aumentar el número de HSCs. La población de partida puede enriquecerse en el marcador de superficie celular de interés o una combinación suya (por ejemplo, CD34+, CD34+CD45RA+/-)

45 Métodos para expandir HSCs

Por tanto, la invención se refiere a un método para expandir células madre hematopoyéticas, que comprende (a) proporcionar una población celular de partida que comprende células madre hematopoyéticas y (b) cultivar dicha población celular de partida ex vivo en condiciones adecuadas para expandir células madre hematopoyéticas.

50 Por tanto, la invención se refiere a un método para expandir células madre hematopoyéticas, que comprende (a) proporcionar una población celular de partida que comprende células madre hematopoyéticas y (b) cultivar dicha población celular de partida ex vivo en condiciones adecuadas para expandir células madre hematopoyéticas.

En una realización específica, dicho método para expandir células madre hematopoyéticas comprende (a) proporcionar una población celular de partida que comprende células madre hematopoyéticas y (b) cultivar dicha población celular de partida ex vivo en presencia del compuesto o composición de la presente invención.

55 La población celular puede someterse primero a etapas de enriquecimiento o purificación, incluida la selección negativa y/o positiva de células basada en marcadores celulares específicos para proporcionar la población celular de partida. Los métodos para aislar dicha población celular de partida sobre la base de marcadores celulares específicos pueden usar tecnología de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) también llamada

- citometría de flujo o sustrato sólido o insoluble al que se unen anticuerpos o ligandos que interactúan con marcadores específicos de la superficie celular. Por ejemplo, las células pueden ponerse en contacto con un sustrato sólido (por ejemplo, una columna de perlas, matraces, partículas magnéticas) que contiene los anticuerpos y se separan las células no enlazadas. Cuando se usa un sustrato sólido que comprende perlas magnéticas o paramagnéticas, las células enlazadas a las perlas pueden aislarse fácilmente mediante un separador magnético.
- 5 En una realización, dicha población celular de partida se enriquece en células CD34+. Los métodos para enriquecer la población de células sanguíneas en células CD34+ incluyen estuches comercializados por Miltenyi Biotec (estuche de aislamiento directo de CD34+, Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Alemania) o por Baxter (Isolex 3000).
- 10 La cantidad de sangre del cordón umbilical de un solo parto es a menudo inadecuada para tratar un adulto o un niño mayor. Una ventaja del método de expansión que utiliza el compuesto o composición de la invención es que permite la producción de una cantidad suficiente de células madre hematopoyéticas a partir de una sola unidad de sangre del cordón umbilical.
- 15 Por consiguiente, en una realización, la población celular de partida se deriva de células de sangre del cordón umbilical neonatal que se han enriquecido en células CD34+. En una realización relacionada, dicha población celular de partida se deriva de una o dos unidades de sangre del cordón umbilical.
- En otra realización, la población celular de partida se deriva de células de sangre periférica movilizadas humanas que se han enriquecido en células CD34+. En una realización relacionada, dicha población celular de partida se deriva de células de sangre periférica movilizadas humanas aisladas de un solo paciente.
- 20 Dicha población celular de partida puede preferiblemente contener al menos 50% de células CD34+, en algunas realizaciones, más del 90% de células CD34+.
- Las condiciones de cultivo de la población celular de partida para la expansión de células madre hematopoyéticas variarán dependiendo de la población celular de partida, el número final de células deseado, y la proporción final deseada de HSCs.
- 25 En una realización específica, en particular usando una población celular de partida de células de sangre del cordón umbilical enriquecidas en células CD34+, las condiciones de cultivo comprenden el uso de otros factores de expansión celular como las citoquinas y factores de crecimiento, generalmente conocidos en la técnica para la expansión de HSCs. Tales citoquinas y factores de crecimiento pueden ser biológicos o moléculas pequeñas e incluyen sin limitación IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, SCF, Flt3-L, trombopoyetina (TPO), eritropoyetina, y sus análogos. Como se usa en la presente memoria, los "análogos" incluyen cualquier variante estructural de las citoquinas y factores de crecimiento que tienen la actividad biológica como las formas que ocurren naturalmente, incluyendo sin limitación, variantes con actividad biológica aumentada o disminuida cuando se comparan con las formas naturales o agonistas del receptor de citoquinas tales como un anticuerpo agonista contra el receptor de TPO (por ejemplo, VB22B sc(Fv)₂ como se detalla en la publicación de patente WO 2007/145227, y similares). Las combinaciones de citoquinas y factores de crecimiento se eligen para expandir las células HSC y progenitoras, a la vez que limitan la producción de células diferenciadas terminalmente. En una realización específica, una o más citoquinas y factores de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste en SCF, Flt3-L y TPO.
- 30 La IL6 humana o interleuquina-6, también conocida como factor 2 estimulante de las células B, ha sido descrita por (Kishimoto, Ann. review of 1 mm. 23:1 2005) y está disponible comercialmente. Se ha descrito el SCF o factor de células madre humano, conocido también como ligando c-kit, factor de crecimiento de mastocitos o factor de acero (Smith, M A et al., ACTA Haematologica, 105, 3:143, 2001) y está disponible comercialmente. Flt3-L o ligando FLT-3, también denominado FL, es un factor que se une al receptor flt3. Se ha descrito (Hannum C, Nature 368 (6472): 643-8) y está disponible comercialmente. Se ha descrito la TPO o trombopoyetina, también conocida como factor de crecimiento de megacariocitos (MGDF) o ligando c-Mpl (Kaushansky K (2006). N. Engl. J. Med. 354 (19): 2034-45) y está disponible comercialmente.
- 35 Los componentes químicos y componentes biológicos mencionados anteriormente pueden usarse no solamente añadiéndolos al medio, sino también inmovilizándolos sobre la superficie del sustrato o soporte usado para el cultivo, hablando específicamente, disolviendo el componente a usar en un disolvente apropiado, revistiendo el sustrato o soporte con la disolución resultante y lavando después un exceso del componente. Dicho componente a usar se puede añadir al sustrato o soporte revestido preliminarmente con una sustancia que se une al componente.
- 40 La expansión de HSC se puede realizar en medio natural, un medio semi-sintético o un medio sintético en términos de composición, y puede ser un medio sólido, un medio semisólido o un medio líquido en términos de estado físico, y cualquier medio nutriente usado para cultivo de células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras hematopoyéticas, que se complementa con las mezclas de factores de expansión celular descritos anteriormente.
- 45 Dicho medio comprende típicamente sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo, cloro, aminoácidos, vitaminas, citoquinas, hormonas, antibióticos, suero, ácidos grasos, sacáridos o similares. En el cultivo, otros componentes químicos o componentes biológicos se pueden incorporar individualmente o en combinación, según lo requiera el caso. Tales componentes a incorporar en el medio pueden ser suero bovino fetal, suero humano, suero de caballo,

insulina, transferrina, lactoferrina, colesterol, etanolamina, selenito sódico, monotioglicerol, 2-mercaptoetanol, albúmina de suero bovino, piruvato sódico, poli(etilenglicol), diversas vitaminas, diversos aminoácidos, agar, agarosa, colágeno, metilcelulosa, diversas citoquinas, diversos factores de crecimiento o similares. Los ejemplos de dicho medio basal apropiado para un método para expandir HSCs incluyen, sin limitación, medio de expansión sin suero StemSpan™ (SFEM) (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), medio definido por StemSpan™ H3000 (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), CellGro™, SCGM (CellGenix, Freiburg Germany), StemPro™-34 SFM (Invitrogen), medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM), mezcla H12 mezcla F12 de nutrientes de Ham, medio 5A de McCoy, medio mínimo esencial de Eagles (EMEM), medio α MEM (medio mínimo esencial de Eagles alfa modificado), medio RPMI1640, medio de Dulbecco modificado por Isocove (IMDM), StemPro34 (Invitrogen), X-VIVO 10 (Cambrex), X-VIVO 15 (Cambrex) y Stemline II (Sigma-Aldrich).

En una realización, el compuesto o la composición de la invención se administra durante el método de expansión de dicha población celular de partida bajo una concentración apropiada para la expansión de HSCs. En una realización específica, dicho compuesto o composición se administra a una concentración comprendida entre 1 y 3000 nmol o por ejemplo entre 1 y 100 nmol.

En una realización específica en donde la población celular de partida consiste esencialmente en células enriquecidas con CD34+ de una o dos unidades de sangre del cordón umbilical, o de células de PB movilizadas o de médula ósea recolectada, las células se cultivan en condiciones para la expansión de HSCs, por ejemplo entre 2 y 21 días y/o hasta que se obtiene la expansión múltiple indicada y las poblaciones celulares características. En una realización específica, las células se cultivan ex vivo en condiciones para la expansión de HSCs no más de 21 días, 12 días, 10 días o 7 días.

La población celular se puede lavar después para separar el compuesto o composición de la invención y/o cualquier otro componente del cultivo celular y resuspenderse en un medio de suspensión celular apropiado para el uso a corto plazo o en un medio de almacenamiento a largo plazo, por ejemplo un medio adecuado para la crioconservación.

Las HSCs y/o células progenitoras hematopoyéticas se pueden cultivar en un recipiente de cultivo generalmente usado para el cultivo de células animales, como una placa de Petri, un matraz, una bolsa de plástico, una bolsa de Teflon™, opcionalmente después de un revestimiento preliminar con una matriz extracelular o una molécula de adhesión celular. El material para tal revestimiento puede ser colágenos Ito XIX, fibronectina, vitronectina, lamininas 1 a 12, nitrógeno, tenascina, trombospondina, factor von Willebrand, osteoponina, fibrinógeno, diversas elastinas, diversos proteoglicanos, diversas cadherinas, desmocolina, desmogleína, diversas integrinas, E-selectina, P-selectina, L-selectina, superfamilia de las inmunoglobulinas, Matrigel, poli-D-lisina, poli-L-lisina, quitina, quitosano, Sefarosa, gel de ácido alginico, hidrogel o un fragmento suyo. Dicho material de revestimiento puede ser un material recombinante que tiene una secuencia aminoacídica modificada artificialmente. Las células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras hematopoyéticas se pueden cultivar usando un biorreactor que puede controlar mecánicamente la composición del medio, el pH y similares y obtener un cultivo de alta densidad (Schwartz R M, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:6760, 1991; Koller M R, Bone Marrow Transplant, 21:653, 1998; Koller, M R, Blood, 82: 378, 1993; Astori G, Bone Marrow Transplant, 35: 1101, 2005).

La invención describe además una población celular con HSCs expandidas, obtenibles u obtenidas mediante el método de expansión descrito anteriormente. En una realización específica, dicha población celular se resuspende en un medio farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración a un huésped mamífero, proporcionando así una composición terapéutica.

La invención describe además la población celular con HSCs expandidas o su composición para usar en trasplantes alogénicos o autólogos de células madre en un sujeto mamífero.

El sujeto referido en la presente memoria es, por ejemplo, un donante de médula ósea o un individuo con, o en riesgo de, niveles de células sanguíneas limitados o agotados. Opcionalmente, el sujeto es un donante de médula ósea antes de la extracción de médula ósea o un donante de médula ósea después de la extracción de médula ósea. El sujeto es opcionalmente un receptor de un trasplante de médula ósea. Los métodos descritos en la presente memoria son particularmente útiles en sujetos que tienen una reserva limitada de médula ósea tales como los sujetos de edad avanzada o sujetos previamente expuestos a un tratamiento inmunodepresor o tratamiento mieloablativo tal como la quimioterapia, por ejemplo para tratar leucemias o linfomas. El sujeto, opcionalmente, tiene un nivel disminuido de células sanguíneas o está en riesgo de desarrollar un nivel disminuido de células sanguíneas en comparación con un nivel de células sanguíneas de control. Como se usa en la presente memoria, la expresión nivel de células sanguíneas de control se refiere a un nivel medio de células sanguíneas en un sujeto antes de, o en sustancial ausencia de, un evento que cambie los niveles de células sanguíneas en el sujeto. Un evento que cambia los niveles de células sanguíneas en un sujeto incluye, por ejemplo, anemia, traumatismo, quimioterapia, trasplante de médula ósea y radioterapia. Por ejemplo, el sujeto tiene anemia o pérdida de sangre debido a, por ejemplo, un traumatismo.

El trasplante puede ser una composición que contiene una disolución tampón, un antibiótico, un producto farmacéutico además de células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras hematopoyéticas expandidas mediante el método de la presente invención.

5 La población de HSCs expandidas o la composición que comprende la población celular con HSCs expandidas se administra al sujeto, por ejemplo, antes, al mismo tiempo, o después de la quimioterapia, radioterapia o un trasplante de médula ósea. El sujeto opcionalmente tiene la médula ósea agotada relacionada con, por ejemplo, el síndrome congénito, genético o adquirido caracterizado por pérdida de médula ósea o médula ósea agotada. Por tanto, el sujeto es opcionalmente un sujeto que necesita hematopoyesis. Opcionalmente, el sujeto es un donante de médula ósea o es un sujeto con, o en riesgo de, médula ósea agotada.

10 La manipulación de células madre hematopoyéticas es útil como tratamiento complementario a la quimioterapia o la radioterapia. Por ejemplo, las HSCs se localizan en la sangre periférica y después se aíslan de un sujeto que se someterá a quimioterapia, y después de la terapia se devuelven las células. Por tanto, el sujeto es un sujeto que se somete, o se espera que se someta, a un tratamiento de agotamiento de las células inmunes tal como la quimioterapia, radioterapia, o que sirva como un donante para un trasplante de médula ósea. La médula ósea es uno de los tejidos más prolíficos del cuerpo y, por tanto, es a menudo el órgano que se daña inicialmente por los fármacos de quimioterapia y la radiación. El resultado es que la producción de células sanguíneas se destruye rápidamente durante el tratamiento de quimioterapia o radiación, y la quimioterapia o la radiación deben terminarse para permitir que el sistema hematopoyético reponga los suministros de células sanguíneas antes de que un paciente se vuelva a tratar con quimioterapia. Por tanto, como se describe en la presente memoria, las HSCs o células sanguíneas producidas por los métodos descritos en la presente memoria se administran opcionalmente a tales sujetos que necesitan células sanguíneas adicionales.

Se proporcionan HSCs expandidas por un compuesto o una composición de la invención como se ha descrito anteriormente en combinación con un agente terapéutico capaz de aumentar la proliferación de HSCs in vivo, in vitro, o ex vivo (por ejemplo, una molécula pequeña, un anticuerpo, o similares) y opcionalmente al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por agente terapéutico capaz de aumentar la proliferación de HSCs se entiende: un anticuerpo agonista contra el receptor de TPO (por ejemplo, VB22B sc(Fv)₂ como se detalla en la publicación de patente WO 2007/145227, y similares); una citoquina tal como SCF, IL-6, ligando Flt-3, TPO o un mimético de TPO (por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO/2007/022269; WO/2007/009120; WO/2004/054515; WO/2003/103686; WO/2002/085343; WO/2002/049413; WO/2001/089457; WO/2001/039773; WO/2001/034585; WO/2001/021180; WO/2001/021180; WO/2001/017349; WO/2000/066112; WO/2000/035446; WO/2000/028987; WO/2008/028645; y similares); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF); una prostaglandina o un agonista del receptor de prostaglandina (por ejemplo, agonista del receptor 1 de la prostaglandina E2 (EP-1), agonista del receptor 2 de la prostaglandina E2 (EP-2), agonista del receptor 3 de la prostaglandina E2 (EP-3) y agonistas del receptor 4 de la prostaglandina E2 (EP-4), como se detalla en la publicación de patente WO/2008/073748); tetraetilenpentamina (TEPA); ligandos de Notch (Delta-1); y/o un agonista WNT. Además, el cultivo de células madre con células madre mesenquimales (MSCs) previene la enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD) y puede ayudar a la expansión de las células madre.

Por farmacéuticamente aceptable se entiende un material que no es biológicamente, o por lo demás, indeseado, es decir, el material se puede administrar a un sujeto o célula sin causar efectos biológicos indeseados o sin interaccionar de manera perjudicial con los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo o excipiente se selecciona para minimizar la degradación del ingrediente activo y para minimizar los efectos secundarios adversos en el sujeto o la célula.

Las composiciones se formulan de cualquier manera convencional para usar en los métodos descritos en la presente memoria. La administración es a través de cualquier ruta que se sepa que es eficaz por un experto en la técnica. Por ejemplo, la composición se administra por vía oral, parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), por inyección intramuscular, por inyección intraperitoneal, por vía transdérmica, extracorpórea, intranasal o tópica.

El método de administración preferido es infusión intravenosa. El número de células transfundidas tendrá en cuenta factores tales como el sexo, edad, peso, los tipos de enfermedad o trastorno, etapa del trastorno, el porcentaje de las células deseadas en la población celular y la cantidad de células necesarias para producir un beneficio terapéutico. En una realización particular, la composición se administra por infusión intravenosa y comprende al menos $\geq 0,3 \times 10^5$ células CD34+/kg o $> 2 \times 10^6$ células CD34+ para sangre del cordón umbilical y $2,5 \times 10^5$ células CD34+/kg o más para médula ósea o células de sangre periférica movilizadas. En una realización específica, todas las células infundidas se derivan de células de sangre expandidas del cordón umbilical de un solo nacimiento.

Las células madre hematopoyéticas expandidas y/o las células progenitoras hematopoyéticas se pueden infundir mediante goteo, por ejemplo en el caso de tratamiento de leucemia, en pacientes tratados previamente con un fármaco contra el cáncer, irradiación corporal total o un fármaco inmunosupresor para la erradicación de las células cancerosas o para facilitar el injerto de células del donante. La enfermedad a ser tratada, el tratamiento previo y el método de trasplante de células se selecciona apropiadamente por la persona a cargo. El injerto de las células madre hematopoyéticas así trasplantadas y/o las células progenitoras hematopoyéticas en el receptor, la

recuperación de la hematopoyesis, la presencia de efectos secundarios del trasplante y el efecto terapéutico del trasplante se pueden evaluar mediante un ensayo ordinario usado en la terapia de trasplantes.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención hace posible expandir las células madre hematopoyéticas y/o las células progenitoras hematopoyéticas y llevar a cabo la terapia de trasplante de manera segura y fácil a corto plazo usando las HSCs expandidas.

También se proporciona en la presente invención un estuche que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes descritos en la presente memoria. Tales estuches comprenden opcionalmente disoluciones y tampones según sea necesario o deseado. El estuche incluye opcionalmente una población expandida de células madre producida mediante los métodos descritos anteriormente o puede contener recipientes o composiciones para producir una población expandida de HSCs. En particular, la invención proporciona un estuche para expandir células madre hematopoyéticas *ex vivo*, que comprende un compuesto como se ha definido en el Compendio de la Invención, e instrucciones para el uso de tal compuesto en un método para la expansión de HSCs y, opcionalmente, uno o más factores de expansión celular, o medios para el cultivo celular, en particular medios para el cultivo de HSCs como se han descrito anteriormente. El estuche puede comprender además anticuerpos para monitorizar la producción de la células, tales como anticuerpos anti-CD34, anti-CD38 y/o anti-CD45RA. En una realización específica, dicho estuche incluye además uno o más factores de expansión celular seleccionados del grupo que consiste en IL6, FLT3-L, SCF y TPO. Opcionalmente asociadas con dicho(s) paquete(s) o estuche(s) están las instrucciones de uso.

Aplicación *in vivo*: También se proporciona un estuche para proporcionar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención para aumentar las HSCs en un paciente, que comprende una o más dosis del compuesto para usar durante un periodo de tiempo, en donde el número total de dosis del compuesto de la invención en el estuche es igual a la cantidad eficaz suficiente para aumentar las HSCs en un sujeto. El periodo de tiempo es de aproximadamente uno a varios días o semanas o meses. Por tanto, el periodo de tiempo es de al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 20, 21, 30, ó 60 días o más o cualquier número de días entre uno y 180.

Ensayos biológicos

Ensayo de cribado

Para identificar los supuestos nuevos agonistas de la auto-renovación de las HSCs, hemos adaptado un ensayo de cribado basado en alto rendimiento para probar una biblioteca de compuestos de moléculas pequeñas (5.280 compuestos de bajo peso molecular) en células CD34+ humanas primarias movilizadas. Debe entenderse que el mismo enfoque se aplica a las células CD34+ de las diversas fuentes conocidas por un experto en la técnica para aislar células CD34+. Las células mononucleares se tiñeron con CD34+APC antihumano de ratón (de BD Pharmingen) y posteriormente se marcaron magnéticamente con microperlas magnéticas anti-APC (de MACS, Miltenyi Biotec.). Las células marcadas magnéticamente se retuvieron usando la columna AutoMACS. Nuestro estudio se basó en el hecho de que las células CD34+CD45RA- derivadas de sangre periférica movilizadas cultivadas en medios complementados con interleuquina-6, trombopoyetina, ligando Flt-3, y factor de células madre, promoverían la expansión de las células mononucleares (MNC) concomitante con una disminución en la población de CD34+CD45RA- y el agotamiento de las HSCs. Por tanto, los compuestos de bajo peso molecular que previenen esta pérdida podrían actuar como agonistas de la expansión de las HSCs.

En una placa de 384 pocillos, se cultivaron 2000 células CD34+/pocillo en 50 μ l de medio que contenía 1 μ M de compuestos de prueba o DMSO al 0,1% (vehículo). La proporción de células CD34+CD45RA- se determinó al comienzo del experimento y tras una incubación de 7 días. Seis de los 5.280 compuestos de diferentes fondos químicos probados inicialmente promovieron la expansión de las células CD34+CD45RA-, y diecisiete (17) mejoraron la diferenciación según lo determinado por el aumento en las proporciones de las células CD34-CD45RA+ en comparación con el control (DMSO). Los seis compuestos que promovían la expansión de la población de células CD34+CD45RA- se volvieron a analizar en una criba secundaria. Cuatro de estos seis compuestos actúan como antagonistas del receptor de hidrocarburos arílicos (AhR), un mecanismo de acción (igual que el SR1's) que muestra que promueve la expansión *ex vivo* de las células huCD34+. Se demostró que los dos compuestos restantes, determinados como que no son antagonistas del receptor de hidrocarburos arílicos (AhR), promovían la expansión de las MNCs incluidas las células CD34+ durante la incubación de 7 días. Uno de esos dos compuestos restantes identificados es el compuesto 1 (Tabla 1).

Se usaron los siguientes ensayos biológicos para evaluar el efecto de los compuestos de la invención sobre la expansión de células madre hematopoyéticas. Medio de cultivo: el medio de cultivo usado consistió en un medio sin suero complementado con las siguientes citoquinas recombinantes: interleuquina-6, trombopoyetina, ligando Flt-3, y factor de células madre, cada uno a una concentración final de 100 ng/ml, en presencia de vehículo (DMSO), control positivo (SR1), o compuesto de la invención o una combinación de compuestos. Cultivo celular: la pureza celular de CD34+ de las cosechas iniciales fue superior al 90%, según lo determinado por citometría de flujo. La subpoblación CD34+CD45RA- alcanzó niveles de pureza superiores al 70%. Las células se colocaron en placas a 40.000 células/ml y se incubaron durante 7 a 12 días a 37°C en CO₂ al 5%. Para cultivos a largo plazo, 200.000 células CD34+/ml se PB (sangre periférica) movilizadas se sembraron en placas con medio sin suero complementado con

interleuquina-6, trombopoyetina, ligando Flt3, y factor de células madre, cada uno a una concentración final de 100 ng/ml, en presencia de vehículo (DMSO), control positivo, o un compuesto de la invención a 500 nM. Después de un cultivo *ex vivo* de 10 días el compuesto 1 (Tabla 1) promovió más de 7 veces la expansión de las MNCs, un aumento de más de 5 veces en las células CD34+ sobre los valores de entrada (día 0), y un aumento de casi 4 veces sobre los valores determinados para el vehículo. Después de 10 días de cultivo *ex vivo*, las células tratadas con el compuesto 1 retuvieron un alto nivel de expresión de CD34 (65,8±5,5%) en comparación con las células cultivadas con vehículo (DMSO) (22,8±0,9%). Además, solo las células tratadas con el compuesto 1 retuvieron la expresión más alta de población CD34+CD45RA- (24,8±0,9%) en comparación con la del vehículo (4,7±0,4%). Los números de CD34+CD45RA- cultivadas con el compuesto 1 aumentaron casi 3 veces en comparación con el del vehículo y 7 veces más que el de entrada. Finalmente, los compuestos de la invención se analizaron en un formato de dosis-respuesta (concentraciones que varían de 1 nM a 5000 nM) para determinar la concentración eficaz que produjo un aumento del 50% en el número de células CD34+CD45RA- en comparación con la condición de vehículo. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

El compuesto 1 no actúa a través de la vía de hidrocarburos arílicos (AhR) (Fig. 1)

A continuación documentamos que el impacto del compuesto 1 en células hematopoyéticas CD34+CD45RA- primitivas es rápidamente reversible en cultivo. Este efecto se muestra mejor en la Figura 2 en donde las células de sangre periférica movilizadas CD34+ se cultivan en presencia del compuesto 1 durante hasta 7 días, momento en el cual el compuesto 1 se separa lavando las células. La línea de puntos verde muestra que la reducción en la proporción de células CD34+ CD45RA- sigue rápidamente a la de los cultivos controlados (DMSO: líneas azul continua y de puntos) mientras que las células mantenidas en presencia del compuesto 1 conservan un fenotipo más primitivo a lo largo del cultivo de 2 semanas (línea verde continua). Estos resultados indican claramente que dentro de los 2 días de la exposición sin compuesto, las células ya han adquirido marcadores de diferenciación como se ve en los cultivos de control. Por tanto, el impacto del compuesto 1 es rápidamente reversible en células humanas primitivas.

El compuesto 1 no es un mitógeno (Fig. 3)

También demostramos que el compuesto 1 no desencadena independientemente la proliferación celular en ausencia de factor de crecimiento. Estos resultados, mostrados en la Figura 3, indican que, de manera similar a lo que se observó con un antagonista del receptor de hidrocarburos arílicos (SR1), el compuesto 1 no pudo inducir la proliferación celular en ausencia de cualquiera de los 3 factores de crecimiento enumerados, a saber, Flt3, TPO y SCF. Esto indica que similar al SR1, el efecto del compuesto 1 en el mantenimiento del fenotipo HSC primitivo *ex vivo* no se debe a un efecto mitogénico sobre esta población, sino más bien sobre la prevención de la diferenciación celular.

El compuesto 1 y el compuesto 40 previenen la diferenciación celular y se sinergizan con el antagonista de AhR (Fig. 4)

También evaluamos el impacto del compuesto 1 y también uno de su potente derivado compuesto 40 en la diferenciación celular usando análisis citológico y citometría de flujo. Ambos tipos de estudios mostraron que el compuesto 1 y su derivado el compuesto 40 previenen la diferenciación celular. Los resultados de FACS se muestran en la Figura 4. La Figura 4A ilustra el impacto del compuesto 1 en la diferenciación de células de sangre periférica movilizadas. Tras una expansión de 7 días, una población relativamente pura (>85% CD34+) de sangre periférica movilizadas se expuso para controlar el (DMSO) o el compuesto 1 o SR1 o el compuesto 1 + SR1. Los resultados indican claramente que las células pierden rápidamente la expresión de la superficie celular de CD34 en los cultivos de control, mientras que este efecto se anula parcialmente al introducir niveles óptimos de SR1 y compuesto 1. Es interesante que tanto SR1 como el compuesto 1 se sinergizan para mantener la expresión de CD34 en la superficie celular. Estas observaciones se han repetido para muestras de sangre del cordón umbilical en la Figura 4B y también con el compuesto 40 en la Figura 4C.

Además de esto, demostramos que el impacto del compuesto 1 o del compuesto 40 es más impresionante en las células que tienen un fenotipo más primitivo. Por ejemplo, las células CD34+CD45RA- (cuadrante superior izquierdo en los paneles inferiores de la Figura 4A a 4C) son más numerosas en cultivos complementados con el compuesto 1 o 40 que en SR1 o en cultivos de control. Nuevamente se observan efectos aditivos del compuesto 1 o del compuesto 40 más SR1 en estos cultivos.

La Figura 4D proporciona una curva de dosis-respuesta que indica la potencia del compuesto 40 para prevenir la desaparición del marcador CD34 en la superficie de la población enriquecida en HSCs humanas primitivas. Nótese la expresión de CD34 que varía con diferentes dosis del compuesto.

Los compuestos 1 y 40 expanden el fenotipo de HSCs humanas *ex vivo* (Fig. 5)

La Figura 5 muestra que el compuesto 1, pero también el compuesto 40, expanden el fenotipo HSC humano *ex vivo* en cultivos tanto a corto como a largo plazo. La Figura 5A muestra que el recuento total de células aumenta aproximadamente 20 veces por encima de la entrada en cultivos iniciados con sangre periférica movilizadas (mPB) CD34+ y se mantiene durante 12 días. El nivel de expansión es el mismo si los cultivos se inician con el compuesto

1, SR1, compuesto 1 + SR1, o control DMSO. De manera muy sorprendente, el impacto del compuesto 1 se observa en una subpoblación de células CD34+CD45RA- más primitivas que se expande aproximadamente diez veces en presencia del compuesto 1 y aproximadamente quince veces en presencia del compuesto 1 + SR1. Esta observación, junto con los resultados presentados en la Figura 4, sugiere firmemente que el compuesto 1 no tiene impacto en la proliferación celular, sino más bien en la prevención de la diferenciación de las células CD34+CD45RA- que conducen a su expansión neta a expensas de las células más maduras. Los resultados de la Figura 5B indican que el compuesto 1 conducirá a una expansión de las células sanguíneas del cordón umbilical CD34+CD45RA- de 30-40 veces durante un periodo de siete días, mientras que estas células se expanden aproximadamente quince veces en presencia de DMSO (control). La Figura 5C muestra resultados similares, pero esta vez con cultivos extendidos a doce días y el compuesto 1 se reemplaza por el compuesto 40. Nuevamente, como se indica en el panel izquierdo, la expansión celular total es la misma si las células están expuestas a DMSO (control), SR1, compuesto 40 o ambos compuestos 40 más SR1. Lo más impresionante es que las células CD34+CD45RA- más primitivas se expanden 80 veces durante 12 días en cultivos complementados con el compuesto 40, mientras que estas células se expanden un poco menos que 20 veces en cultivos iniciados con SR1, los que muestra la superioridad de este compuesto sobre el antagonista del represor de hidrocarburos arílicos.

En resumen, estos resultados muestran que el compuesto 1 y el compuesto 40 tienen efectos importantes sobre la expansión de CD34⁺ y la población más primitiva de CD34⁺ CD45RA⁻, ambas con CD34⁺ derivadas de células de sangre periférica o del cordón umbilical movilizadas.

Las funcionalidad *ex vivo* de las células expandidas se probó usando las unidades convencionales de formación de colonias en el ensayo de cultivo (CFU-C). Las células no tratadas o las células incubadas con DMSO, control positivo o un compuesto de la invención se sembraron en placas en medio de metilcelulosa en condiciones convencionales. Como ejemplo, el compuesto 1 (Tabla 1, Ejemplo 1) expande el número de progenitores hematopoyéticos multipotentes. El cultivo con metilcelulosa de 1000 células CD34⁺ de mPB tratadas con compuesto 1 durante 10 días dio como resultado un aumento de 5 veces en colonias multilíneaje (GEMM) de granulocitos eritrocitos, macrófagos y megacariocitos sobre las células de entrada y un aumento de 10 veces en comparación con las células de control. Esto sugiere que el compuesto 1 descrito en la presente memoria promueve también la expansión de células progenitoras multipotentes.

Impacto del compuesto 1 sobre HSC de mPB cultivada, evaluado usando el modelo de ratón NSG (Fig. 6)

Evaluamos a continuación el impacto del compuesto 1 y el compuesto 40 en HSC humana de sangre periférica movilizada y sangre del cordón umbilical expandida *in vitro* durante diez a doce días y se introdujo *in vivo* en el modelo de ratón NSG. El objetivo de estos experimentos es verificar que el impacto de nuestro compuesto sobre el fenotipo de la HSC primitiva mostrado en las Figuras 4 y 5 se observa también sobre las células madre/progenitoras de la médula ósea repobladoras a largo plazo. La Figura 6 muestra la reconstitución de médula ósea de ratón por células humanas evaluadas trece semanas después del trasplante. Para la sangre movilizada, el resultado de 50.000 y 500.000 células se presenta en 6A. Como se muestra ahí, el agonista SR1 de HSC fue consistentemente mejor que el DMSO (control) en la expansión de células madre humanas según se evaluó en el modelo de ratón NSG. Nuevamente el compuesto 1 parece ser superior a SR1 en estos experimentos. Como se ve en los cultivos *in vitro*, el compuesto 1 y SR1 mostraron un efecto sinérgico en estos experimentos (Fig. 6).

Impacto del compuesto 1 y 40 sobre HSC de sangre del cordón umbilical (CB) cultivada, evaluado usando el modelo de ratón NSG (Fig. 7)

La Figura 7 muestra el impacto del compuesto 1 y compuesto 40 sobre HSC humana de sangre de cordón umbilical cultivada, evaluado *in vivo* en el modelo de ratón NSG. Los resultados de la Figura 7A indican que el compuesto 1 tiene un claro efecto sobre la actividad de reconstitución de las células humanas en comparación con los cultivos de control. Estos experimentos se hicieron en cultivos a corto plazo, es decir, 7 días. Lo más importante es que la Figura 7B indica que el compuesto 40 tiene un efecto bastante importante con niveles medios de reconstitución en el 10% en comparación con el 2% para el control con DMSO cuando se usan 1500 células CD34⁺. El mayor impacto del compuesto 40 en este experimento sobre el compuesto 1 (Figura 7A) se debe potencialmente al periodo de cultivo más largo usado en los experimentos descritos en la Figura 7B. Se proporcionan experimentos *in vivo* más definitivos en la siguiente sección usando periodos de cultivo más largos (12 a 16 días).

Impacto del compuesto 1 y 40 sobre HSC de sangre del cordón umbilical (CB) cultivada, evaluado usando el modelo de ratón NSG (Fig. 8)

Zandstra et al. documentaron recientemente que un nuevo método llamado fed-batch (lote alimentado) optimiza las condiciones *in vitro* que conducen a la expansión de HSCs humanas (patente de EE.UU. no. US7.795.024). Queríamos verificar si los compuestos de la invención son activos en estas condiciones de lote alimentado previamente optimizadas. Para estos estudios, evaluamos la expansión de células madre hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón umbilical (HSCs) después de cultivo *in vitro* con lote alimentado + compuesto 40 durante 12 ó 16 días. Los números de HSCs se evaluaron basándose en el injerto de células humanas en ratones inmunodeficientes.

Como se muestra en la Figura 8, la adición de compuesto 40 (Cpd 40) proporcionó un efecto importante en la expansión de todas las poblaciones probadas incluidas las células CD34+CD45RA- hasta al menos 16 días. Este efecto fue lo más impresionante en los puntos de tiempo de 12 a 16 días, lo que demuestra claramente la sinergia entre el lote alimentado (FB en la Fig. 8) y el compuesto 40.

- 5 Además, las células CD34+ recién enriquecidas y las células expandidas durante 12 ó 16 días se trasplantaron en ratones hembra NOD/SCID/IL-2Ryc-null (NSG), que se habían irradiado de forma sub-lethal (250 rad) 24 h antes del trasplante. Las células se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola. En puntos de tiempo definidos (semana 3, semana 9, y semana 16), los animales fueron sacrificados y se extrajo médula ósea de dos tibias y dos fémures. La médula ósea se agotó en glóbulos rojos y se evaluó mediante citometría de flujo para
- 10 cuantificar el injerto de células humanas. Las células se consideraron positivas para injerto si $\geq 0,5\%$ de las células eran positivas para CD45 humano y HLA-ABC humano. En cada momento de la evaluación, algunos animales fueron enviados para un análisis histológico independiente.

- Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, al final de las 16 semanas, hay una dosis respuesta de injerto para cada condición. El análisis de dilución limitante reveló que la mayor expansión de HSCs se produjo mediante el
- 15 cultivo de 12 días de lote alimentado+compuesto 40 (18,4 veces). Esta fue significativamente mayor que la expansión producida por el cultivo de 12 días de control de lotes alimentados (8,1 veces). Una expansión superior se produjo mediante ambas condiciones con el cultivo de 12 días en comparación con el cultivo de 16 días. Estos resultados proporcionan una demostración inequívoca de la expansión neta de HSCs humanas in vitro en presencia de compuesto 40 y su actividad en condiciones de lote alimentado (Fig. 8 + Tabla 2).

- 20 Tabla 2. Compendio de los datos de dilución limitante para el injerto en la semana 16.

Condición	frecuencia de HSCs	expansión de TNC (células nucleadas totales)	equivalente de HSC el día 0	Expansión neta de HSC*
Día 0 nuevo	1/6115	NA (no disponible)	1/6115	NA (no disponible)
Día 12 lote alimentado	1/117676	156	1/754,3	8,1
Día 12 lote alimentado + comp. 40	1/54548	164	1/332,6	18,4
Día 16 lote alimentado	1/635952	413	1/1539,8	4
Día 16 lote alimentado + comp. 40	1/323585	495	1/653,7	9,4

* Expansión neta de HSC = (# HSC Día 0)/(# HSC día 12 o día 16); medida usando el análisis de dilución limitante (LDA) en ratones NSG en la semana 16

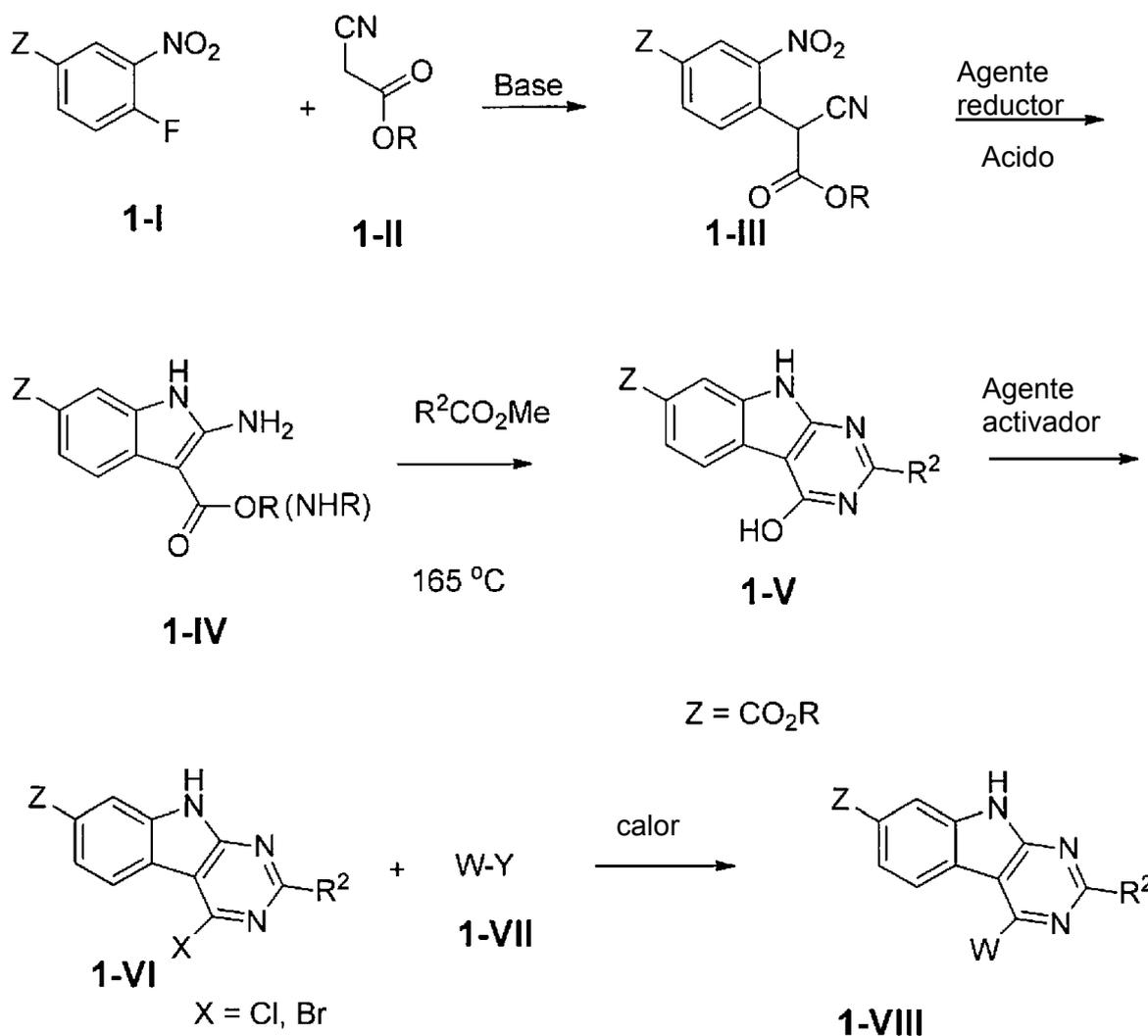
Metodología de síntesis

- 25 La metodología de síntesis descrita a continuación se refiere a realizaciones de la invención en donde el sustituyente Z está en la posición 7 del núcleo de pirimido indol. Como entenderá un experto en la técnica, se puede realizar una metodología de síntesis similar, con variaciones que son evidentes para tal experto, para realizaciones de la invención en donde el sustituyente Z está en una posición diferente, tal como por ejemplo en la posición 5, 8 ó 6, particularmente en la posición 6.

- 30 El esquema 1 describe la síntesis del precursor común (1-VI) para los compuestos de la presente invención. En la primera etapa, un fluoruro de arilo 1-I se trata con un cianoacetato de alquilo 1-II en presencia de una base tal como, pero no limitada a, hidruro sódico. El producto resultante 1-III se trata después con un agente reductor tal como, pero no limitado a, polvo de zinc en ácido acético para proporcionar aminoindoles 1-IV que se convierten en pirimidinas 1-V tras el tratamiento con formamida y formiato amónico. Los compuestos 1-V se tratan con reactivos tales como cloruro de fosforilo o bromuro de fosforilo para proporcionar los compuestos intermedios reactivos 1-VI que se tratan
- 35 con aminas 1-VII para proporcionar los compuestos 1-VIII de la presente invención.

5

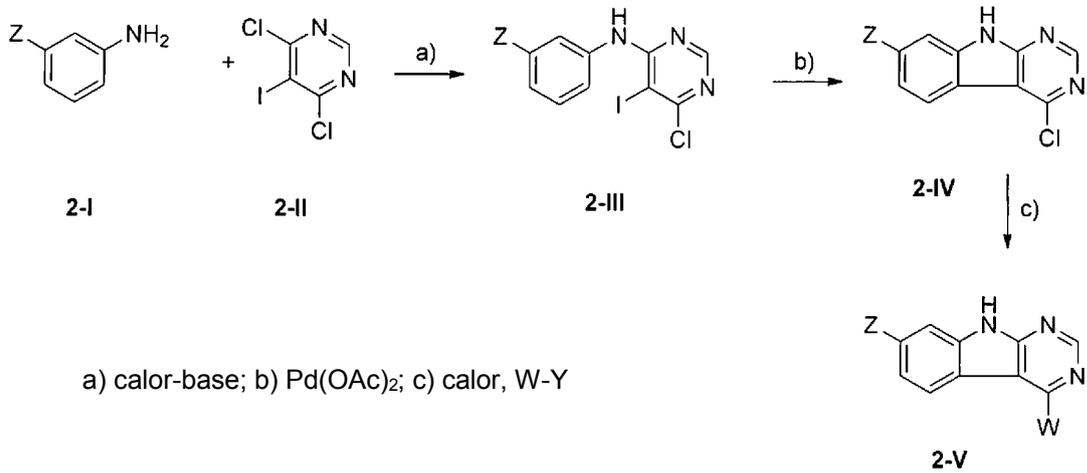
Esquema 1



10 El esquema 2 describe la preparación de los compuestos **2-V**. La reacción de 4,6-dicloro-5-yodopirimidina **2-II** y el correspondiente fenol, anilina o tiofenol **2-I** con o sin una base (Morsin M. et al. *Chemistry-A European Journal*, 2009, vol. 15, #6, pp. 1468-1477) o un catalizador de paladio para dar los compuestos intermedios **2-III**. Los compuestos intermedios resultantes **2-III** se convierten en el aducto tricíclico **2-IV** con Pd(OAc)₂ (Zhang M. et al. *Tetrahedron Letters*, 2002, vol.43, p. 8235). Finalmente, según el ejemplo 1 descrito a continuación en la presente memoria, se obtienen los compuestos de la presente invención **2-V**.

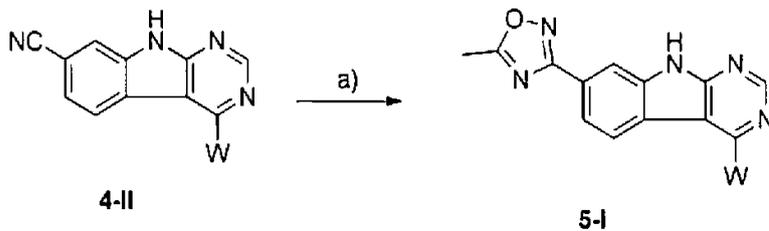
15

Esquema 2



Esquema 3: Los compuestos **4-II** se tratan con hidroxilamina seguida por dimetilacetal de dimetilacetamida (Tully W.R. et al. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1991, vol. 34, p. 2060. Esto da los compuestos **5-I**.

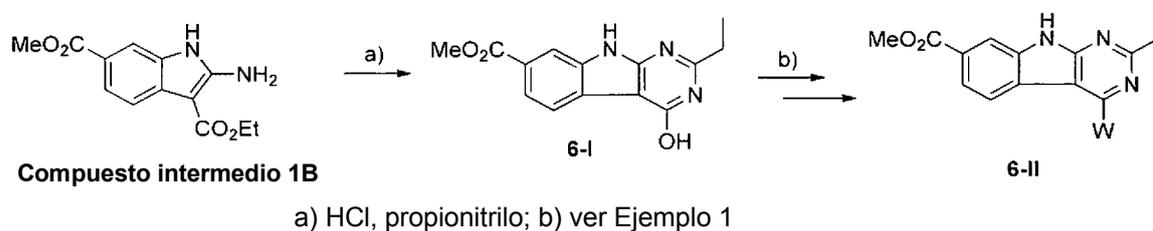
Esquema 3



a) 1-NH₂OH, acetal 2-DMA

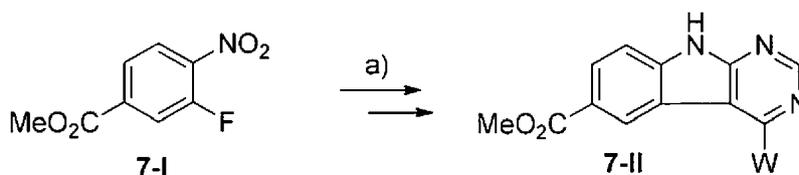
5 Esquema 4: El compuesto intermedio 1B (Ejemplo 1 de esta memoria a continuación) se trata con propionitrilo en HCl/dioxano seguido por un tratamiento básico para proporcionar 2-etil-4-hidroxi-9H-pirrido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (**6-I**). Después se obtienen los compuestos **6-II** de acuerdo con los procedimientos descritos para el Ejemplo 1.

Esquema 4



Esquema 5: Partiendo de 3-fluoro-4-nitrobenzoato de metilo **7-I** y según el procedimiento del Ejemplo 1, se obtienen los compuestos **7-II**.

Esquema 5



a) ver Ejemplo 1

EJEMPLOS

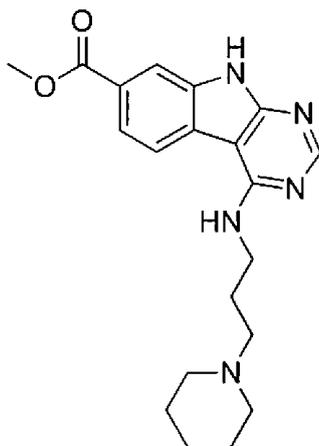
General

- 5 Los tiempos de retención de HPLC descritos son para HPLC de fase reversa (Agilent, 1200 series) usando las siguientes condiciones; disolvente A: MeOH:H₂O:TFA (5:95:0,05); disolvente B: MeOH:H₂O:TFA (95:5:0,05); caudal: 3,0 mL/min; gradiente de 0 a 100% de B en 2,0 minutos; columna: ZorbaxC18, 3,5 micrómetros, 4,6 x 30 mm; longitud de onda 220 nm.

- 10 Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro 6210 G1969A LC/MSD TOF de Agilent Technologies o en un cuadrupolo LC/MS Modelo G6120B de Agilent Technologies usando las siguientes condiciones de LC: disolvente A: AcCN:H₂O:HCOOH (5:95:0,05); disolvente B: AcCN:H₂O:HCOOH (95:5:0,05); gradiente 0 a 100% de B en 2,0 minutos; caudal: 0,3 mL/min; columna: ZorbaxC18, 3,5 micrómetros, 2,1 x 30 mm; longitud de onda 220 nm.

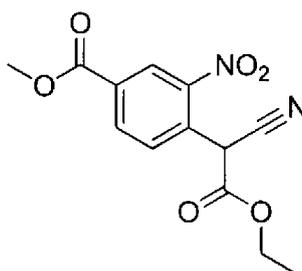
Procedimientos experimentales

Ejemplo 1



4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo

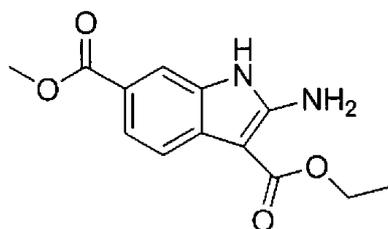
Compuesto intermedio 1A



4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-3-nitrobenzoato de metilo

Se añadió lentamente 2-cianoacetato de etilo (10,9 mL, 102 mmoles) a una suspensión al 60% de hidruro sódico (4,10 g, 102 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida (125 mL) a 0°C para dar una suspensión gris. La mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos y se añadió 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (10,2 g, 51 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida (125 mL). La mezcla roja intensa resultante se agitó a 0°C durante 30 minutos y a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con HCl 1 N (40 mL) y acetato de etilo (40 mL). La capa acuosa separada se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL). Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y concentraron para proporcionar un residuo (26 g) que se purificó por cromatografía flash (comenzó con hexanos al 100% y se añadieron gradualmente incrementos de acetato de etilo para completar con acetato de etilo al 100%) para proporcionar 14,9 g del compuesto del título. LCMS *m/z* 291,0 (*M* - *H*)-, tiempo de retención (en HPLC analítica) = 1,76 minutos.

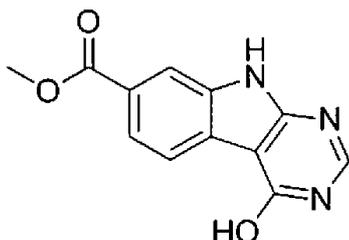
Compuesto intermedio 1B



2-amino-1H-indol-3,6-dicarboxilato de 3-etilo y 6-metilo

- 5 En un matraz de fondo redondo de 500 mL se añadió 4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-3-nitrobenzoato de metilo (14,9 g, 51,0 mmoles) y polvo de zinc (16,7 g, 255 mmoles) en ácido acético (255 mL) para dar una suspensión gris. La adición de zinc se realizó durante 35 minutos a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y fue bastante exotérmica. La mezcla se calentó a 100°C durante 15 horas. La mezcla se dejó enfriar, se filtró a través de Celite y se enjuagó con acetato de etilo. La evaporación proporcionó un residuo que se trituró en diclorometano-hexanos y proporcionó después de filtrar 6,3 g del compuesto del título. LCMS m/z 263,2 (M + H)⁺, tiempo de retención (en HPLC analítica) = 1,90 minutos.

Compuesto intermedio 1C

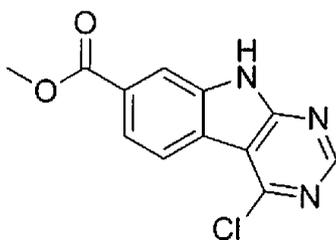


4-hidroxi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo

- 10 En un matraz de fondo redondo de 100 mL se añadió 2-amino-1H-indol-3,6-dicarboxilato de 3-etilo y 6-metilo (1,1 g, 4,19 mmoles), formiato amónico (0,53 g, 8,39 mmoles), y formamida (16,7 mL, 419 mmoles) para dar una suspensión de color canela que se calentó a 165°C durante 12 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió agua. El precipitado resultante se filtró, se secó al aire y se secó a alto vacío durante la noche para proporcionar 1,1 g del compuesto del título. LCMS m/z 244,2 (M + H)⁺, tiempo de retención (en HPLC analítica) = 1,51 minutos.

15

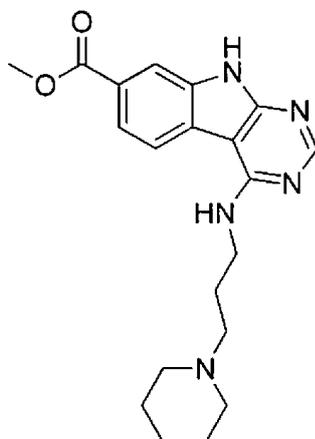
Compuesto intermedio 1D



4-cloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo

- 20 En un matraz de fondo redondo de 100 mL se calentó una mezcla de 4-hidroxi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (1,1 g, 4,5 mmoles) y oxicluro de fósforo (15 mL, 161 mmoles) a 90°C durante 16 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida. El residuo se suspendió en diclorometano (20 mL) y se filtró a través de Celite. La evaporación proporcionó el compuesto del título como un sólido de color anaranjado (360 mg). LCMS m/z 262,0 (M+H)⁺, tiempo de retención (en HPLC analítica) = 2,02 minutos.

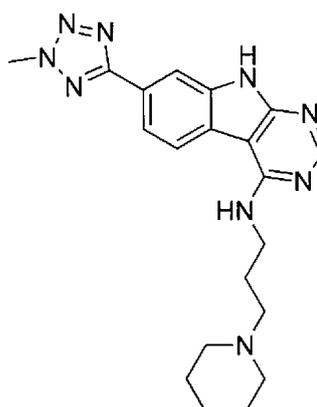
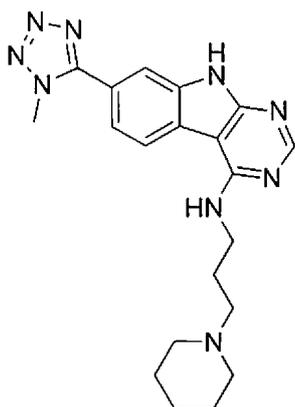
Ejemplo 1



4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo

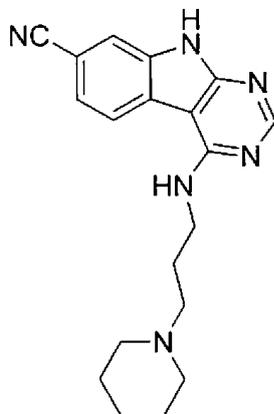
En un vial de microondas de 2-5 mL se añadió 4-cloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (86 mg, 0,33 mmoles), trietilamina (0,09 mL, 0,66 mmoles) y 3-(piperidin-1-il)propan-1-amina (0,078 mL, 0,49 mmoles) en metanol (2 mL) y la mezcla se calentó a 140°C durante 15 minutos en un reactor de microondas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida. El material sin purificar se disolvió en *N,N*-dimetilformamida y se purificó en una columna Zorbax SB-C18 de fase reversa de 21,2 x 100 mm y se eluyó con MeOH - agua - TFA al 0,1%. Gradiente: isocrático 20% durante 4 minuto(s) después gradiente a 100% de MeOH durante 15 minutos. El compuesto del título se obtuvo como la sal del ácido trifluoroacético (la correspondiente base libre y la sal HCl se prepararon de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica). LCMS *m/z* 368,2 (*M+H*)⁺, tiempo de retención (en HPLC analítica) = 1,38 minutos.

10 Ejemplo 14



7-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina y
7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina.

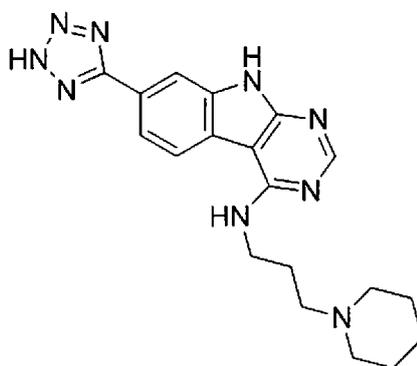
Compuesto intermedio 14A



4-((3-(piperidin-1-yl)propil)amino)-9H-pirrimido[4,5-b]indol-7-carbonitrilo

A partir de 4-fluoro-3-nitrobenzonitrilo, el compuesto intermedio 2A se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

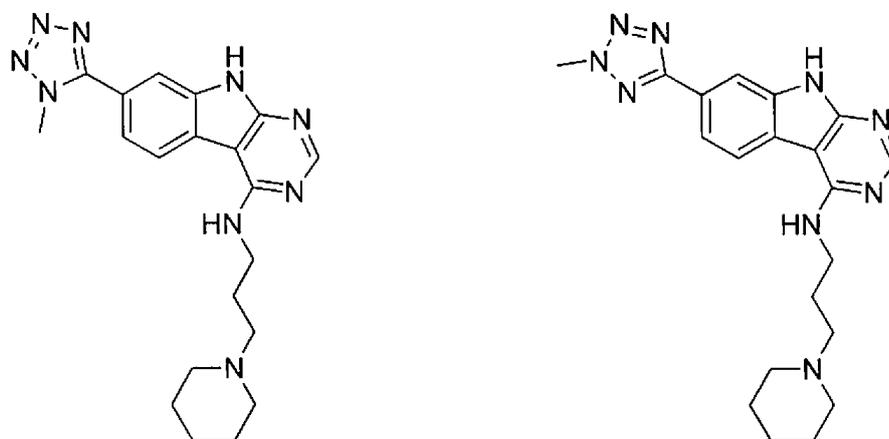
Compuesto intermedio 14B



N-(3-(piperidin-1-yl)propil)-7-(2H-tetrazol-5-yl)-9H-pirrimido[4,5-b]indol-4-amina

5 En un vial de microondas de 2-5 mL se añadió 4-((3-(piperidin-1-yl)propil)amino)-9H-pirrimido[4,5-b]indol-7-carbonitrilo (47,5 mg, 0,142 mmoles) y azidotributilestaño (409 μ l, 1,491 mmoles) en (trifluorometil)benceno (2 mL) para dar una suspensión de color canela. El vial se colocó en el microondas y se calentó a 180°C durante 30 minutos. La mezcla se concentró a sequedad y se añadió MeOH (3 mL) seguido por HCl 4 M en dioxano (1,07 mL, 4,26 mmoles) para obtener una disolución amarilla. A la disolución resultante se añadió éter dietílico (3 mL), se agitó a 20°C durante 16 horas. El sólido obtenido se recogió en un Buchner. La torta se lavó con éter dietílico (3 x 1 mL) y con hexano (3 x 1 mL) y el sólido se secó a 30°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar 56 mg del compuesto del título como sal HCl. LCMS m/z 378,2 (M+H)⁺, tiempo de retención (en HPLC analítica) = 1,30 minutos.

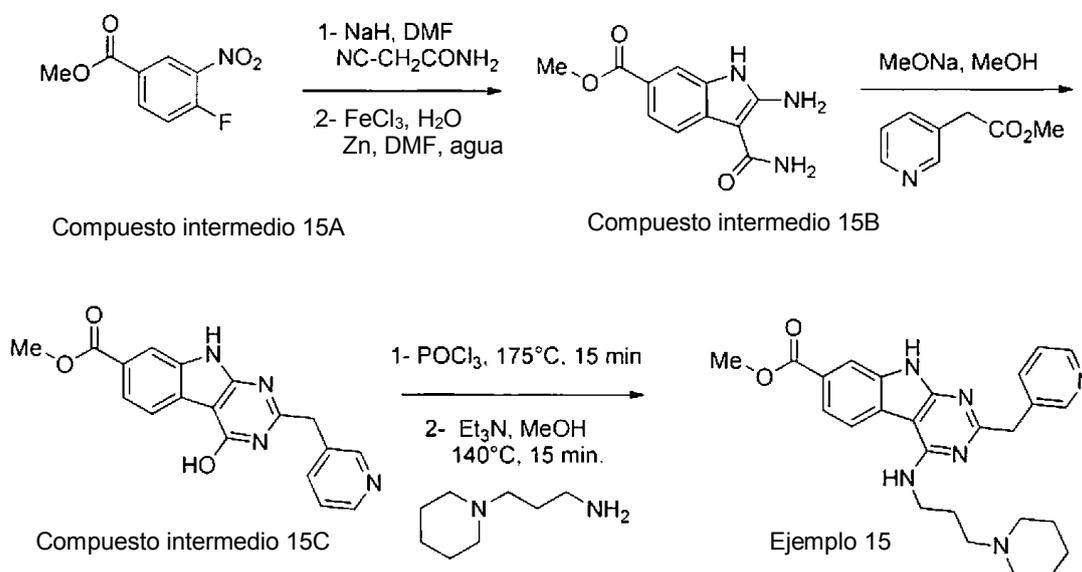
Ejemplo 14



7-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina y 7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina

En un matraz de fondo redondo de 25 mL se añadió hidrocloreuro de N-(3-(piperidin-1-il)propil)-7-(2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina (43 mg, 0,10 mmoles) y *N,N*-diisopropiletilamina (36 μ l, 0,21 mmoles) en tetrahidrofurano (2 mL) y metanol (0,5 ml) para dar una suspensión de color canela. Se añadió después trimetilsilildiazometano 2 M en hexano (260 μ l, 0,52 mmoles). La resultante suspensión de color amarillo claro se agitó a 20°C durante 3 horas y se añadió ácido acético (59 μ l, 1,04 mmoles). La agitación se continuó durante 30 minutos y los disolventes se separaron a vacío para proporcionar un residuo que se purificó por cromatografía flash (se partió de diclorometano al 100% y gradualmente se añadió una mezcla de incrementos de diclorometano : metanol: hidróxido amónico acuoso al 28% en peso (90 : 10 : 1) para completar con diclorometano al 100% : methanol: hidróxido amónico acuoso al 28% en peso (90 : 10 : 1). El primer producto obtenido por elución fue 7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina (19 mg). LCMS m/z 392,2 (M+H)⁺, tiempo de retención (en HPLC analítica) = 1,44 minutos. El segundo producto de elución fue 7-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina (5 mg). LCMS m/z 392,2 (M+H)⁺, tiempo de retención (en HPLC analítica) = 1,27 minutos.

Ejemplo 15



Se añadió NaH (3,41 g, 85 mmoles) en porciones a una disolución fría de 2-cianoacetamida (7,18 g, 85 mmoles) en DMF (53 mL). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se añadió gota a gota una disolución de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (8,5 g, 42,7 mmoles) en 15 mL de DMF. Después de 3 horas se añadió una mezcla de hielo, agua y 12 mL de HCl (10%). El sólido resultante se filtró, se enjuagó con agua y se secó a alto vacío durante la noche para dar 9,1 g de 4-(2-amino-1-ciano-2-oxoetil)-3-nitrobenzoato de metilo: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3,93 (s, 3 H) 5,78 (s, 1 H) 7,77 (s, 1 H) 7,91 (d, $J=7,83$ Hz, 1 H) 8,04 (s, 1 H) 8,39 (dd, $J=8,02, 1,76$ Hz, 1H) 8,56 (d, $J=1,56$ Hz, 1 H).

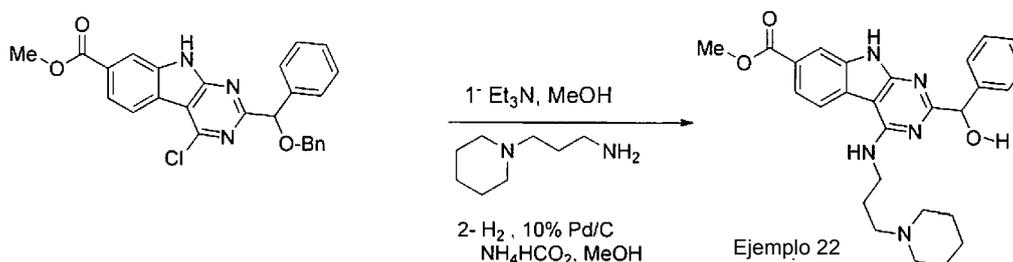
Se añadió cloruro férrico hexahidratado (1,540 g, 5,70 mmoles) y zinc (1,242 g, 19,00 mmoles) a una disolución de la cianoamida sin purificar preparada anteriormente (0,5 g, 1,900 mmoles) en DMF (4,75 mL) y agua (4,75 mL) para dar una suspensión de color amarillo. Después de la exotermia, la mezcla se calentó a 100°C durante 45 minutos y después se enfrió lentamente a 20°C y agitó durante 22 horas. El sólido se filtró, se lavó con DMF (3 x 3 mL) y el filtrado se diluyó con agua (40 mL) mientras se agitaba a 0°C . El sólido se filtró y la torta se lavó con agua (2 x 5 mL). El sólido contiene principalmente impurezas. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (50 mL) y después con salmuera (30 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y concentró para dar 287 mg como un sólido marrón que se trató con acetona (6 mL) para dar una suspensión sólida que se diluyó con hexano (5 mL). El sólido se recogió después y se secó a 40°C a alto vacío hasta peso constante para dar el compuesto intermedio 15B 2-amino-3-carbamoil-1H-indol-6-carboxilato de metilo (162 mg, rendimiento de 36,6%) como un sólido blanquecino: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3,80 (s, 3 H) 6,62 (br. s., 2 H) 7,04 - 7,18 (m, 2 H) 7,53 - 7,63 (m, 2 H) 7,72 (s, 1 H) 10,80 (s, 1 H); MS m/z 232,2 (M+H) $^+$; HPLC aprox. 96%, RT (tiempo de retención) = 1,37 minutos.

Una mezcla de compuesto intermedio 15B (0,100 g, 0,429 mmoles), 2-(piridin-3-il)acetato de metilo (0,130 g, 0,858 mmoles) y metóxido sódico al 25% en peso en MeOH (0,196 mL) en metanol (0,954 mL) se colocó en el horno de microondas y se calentó a 140°C durante 45 minutos. Tras enfriar, se añadió AcOH (0,050 mL, 0,879 mmoles) y la suspensión resultante se agitó a 20°C durante 1 hora. Los sólidos se filtraron, se lavaron con MeOH (3 x 0,5 mL), se secaron a 20°C a alto vacío hasta peso constante para dar el compuesto intermedio 15C: 4-hidroxi-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (82 mg, rendimiento de 57,2%) como un sólido marrón: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3,87 (s, 3 H) 4,09 (s, 2 H) 7,34 - 7,40 (m, 1 H) 7,79 (dt, $J=8,1, 1,8$ Hz, 1 H) 7,83 (dd, $J=8,2, 1,2$ Hz, 1 H) 7,99 (d, $J=0,8$ Hz, 1 H) 8,02 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 8,48 (dd, $J=4,9, 1,4$ Hz, 1 H) 8,60 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 12,49 (br. s., 2 H); MS m/z 335,2 (M+H) $^+$; HPLC 95,2% @ 220 nm y 92,8% @ 254 nm, RT = 1,42 minutos.

Una mezcla de 4-hidroxi-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,050 g, 0,150 mmoles) en POCl_3 (0,948 mL, 10,17 mmoles) se colocó en un vial y se calentó a 175°C durante 15 minutos en un horno de microondas. Tras enfriar, la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo (19 mL) y después se basificó a pH 8 mediante la adición lenta de NaOH acuoso al 50% (2,7 mL) y finalmente se diluyó con EtOAc (20 mL), los sólidos se filtraron (primera cosecha del cloruro) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (20 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y concentraron a sequedad para proporcionar una cosecha adicional de 35 mg del derivado de cloruro deseado. Las cosechas aisladas combinadas de 4-cloro-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (53 mg, rendimiento de 100%) se usaron directamente en la siguiente etapa.

Una mezcla de 4-cloro-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,053 g, 0,150 mmoles), 3-(piperidin-1-il)propan-1-amina (0,072 mL, 0,451 mmoles) y trietilamina (0,063 mL, 0,451 mmoles) en MeOH (2,5 mL) se colocó en un vial y se calentó a 140°C durante 15 minutos en un horno de microondas durante 15 minutos. Después de enfriar y evaporar el disolvente, el residuo se purificó por cromatografía flash para dar 23 mg de un aceite amarillo + sólido que se diluyó con CH_3CN (3 mL) y se agitó durante 30 minutos. Los sólidos se filtraron y lavaron con CH_3CN (2 x 0,5 mL), después se secaron a 30°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar el compuesto del Ejemplo 15: 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(piridin-3-ilmetil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (11 mg, rendimiento de 16%) como un sólido color canela: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1,31 - 1,44 (m, 2 H) 1,44 - 1,56 (m, 4 H) 1,71 - 1,86 (m, 2 H) 2,17 - 2,47 (m, 6 H) 3,56 - 3,66 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,08 (s, 2 H) 7,28 - 7,34 (m, 1 H) 7,43 (t, $J=5,5$ Hz, 1 H) 7,76 (dt, $J=7,8, 2,0$ Hz, 1 H) 7,81 (dd, $J=8,2, 1,4$ Hz, 1 H) 7,99 (d, $J=1,4$ Hz, 1 H) 8,35 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 8,41 (dd, $J=4,7, 1,6$ Hz, 1 H) 8,59 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 12,08 (s, 1 H); MS m/z 459,2 (M+H) $^+$; HPLC >99,5%, RT = 1,43 minutos.

Ejemplo 22

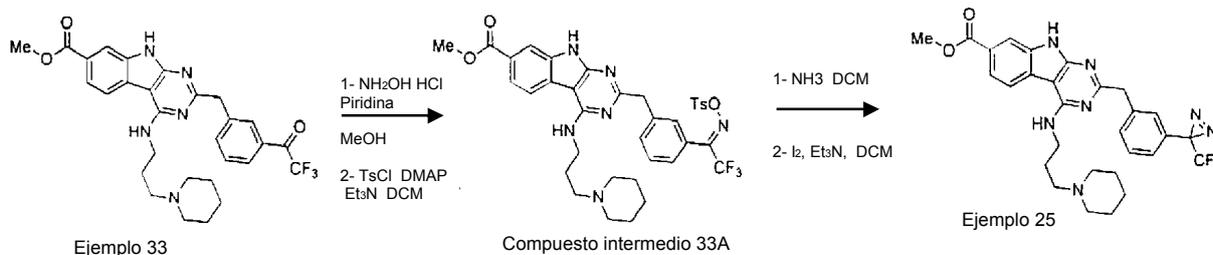


Una mezcla de 2-((benciloxi)(fenil)metil)-4-cloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (preparado como se describe para el Ejemplo 15, 0,228 g, 0,498 mmoles), 3-(piperidin-1-il)propan-1-amina (0,158 mL, 0,996 mmoles) y trietilamina (0,173 mL, 1,245 mmoles) en MeOH (3,8 mL) se colocó en el horno de microondas y se calentó a 140°C durante 30 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía flash para proporcionar 2-((benciloxi)(fenil)metil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (172 mg, rendimiento de 61,3%) como un sólido de color amarillo claro: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,29 - 1,42 (m, 2 H) 1,42 - 1,56 (m, 4 H) 1,72 - 1,91 (m, 2 H) 2,18 - 2,47 (m, 6 H) 3,66 (tt, J=13,2, 6,6 Hz, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,54 (d, J=11,7 Hz, 1 H) 4,64 (d, J=12,1 Hz, 1 H) 5,50 (s, 1 H) 7,21 - 7,43 (m, 8 H) 7,51 (t, J=5,9 Hz, 1 H) 7,57 (d, J=7,0 Hz, 2 H) 7,82 (dd, J=8,2, 1,2 Hz, 1 H) 8,00 (d, J=1,2 Hz, 1 H) 8,38 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,22 (s, 1 H); HRMS (espectrometría de masas de alta resolución) m/z 564,2979 (M+H)⁺; HPLC 99,6%, RT = 2,02 minutos.

La hidrogenolisis del grupo bencilo se realizó en el derivado 2-((benciloxi)(fenil)metil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,042 g, 0,075 mmoles) en presencia de Pd-C al 10% en peso (50% húmedo) (0,159 g, 0,075 mmoles) y formiato amónico (0,235 g, 3,73 mmoles) bajo hidrógeno en metanol. Después de 26 horas de agitación a 55°C, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite, se enjuagó con MeOH, y se concentró a sequedad en un rotavapor para dar 133 mg de un residuo que se purificó por HPLC RP (fase reversa) usando una columna Zorbax SB-C18 de 21,2 x 150 mm eluida con MeOH - agua - TFA al 0,1% para proporcionar 21,9 mg (rendimiento de 50%) de Ejemplo 22: 2-(hidroxi(fenil)metil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo, sal de TFA como un sólido blanco: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,30 - 1,43 (m, 1 H) 1,52 - 1,73 (m, 3 H) 1,79 (br, d, J=14,5 Hz, 2 H) 1,96 - 2,09 (m, 2 H) 2,54 (s, 1 H) 2,74 - 2,89 (m, 2 H) 3,11 (dt, J=10,4, 5,4 Hz, 2 H) 3,38 (d, J=12,1 Hz, 2 H) 3,71 - 3,77 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 5,63 (s, 1 H) 7,19 - 7,26 (m, 1 H) 7,27 - 7,35 (m, 2 H) 7,48 - 7,56 (m, 2 H) 7,62 (t, J=5,9 Hz, 1 H) 7,85 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 1 H) 8,03 (d, J=1,4 Hz, 1 H) 8,38 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 8,92 (br, s, 1 H) 12,21 (s, 1 H); HRMS m/z 474,2511 (M+H)⁺; HPLC >99%, RT = 1,68 minutos.

Se añadió reactivo peryodinano de Dess-Martin (22,67 mg, 0,053 mmoles) a una mezcla de 2-(hidroxi(fenil)metil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (compuesto del Ejemplo 22) y TFA (15,7 mg, 0,027 mmoles) en DCM (1000 μL, 15,54 mmoles) para dar una disolución de color naranja claro. Después de 1 h, el disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía flash para proporcionar el Ejemplo 23: 2-benzoil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (10 mg, rendimiento de 79%) como un sólido amarillo brillante: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,27 - 1,36 (m, 2 H) 1,36 - 1,48 (m, 4 H) 1,74 - 1,88 (m, 2 H) 2,14 - 2,44 (m, 6 H) 3,52 - 3,68 (m, 2 H) 3,91 (s, 3 H) 7,54 (t, J=7,8 Hz, 2 H) 7,69 (t, J=7,4 Hz, 1 H) 7,76 (t, J=5,1 Hz, 1 H) 7,90 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 1 H) 7,94 (d, J=7,0 Hz, 2 H) 8,10 (d, J=1,4 Hz, 1 H) 8,52 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,43 (s, 1 H); HRMS m/z 472,2342 (M+H)⁺; HPLC 97,1% @ 220 nm y 98,9% @ 254 nm, RT = 1,86 minutos.

Ejemplo 25



Se añadió hidrocloreto de hidroxilamina (0,08 g, 1,2 mmoles) a 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoroacetil)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (compuesto del Ejemplo 33) (0,285 g, 0,515 mmoles) en MeOH (4,00 mL) y piridina (0,666 mL) para dar una disolución de color amarillo. Tras calentar a 60°C 5 días, la mezcla se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en DCM (75 mL) y MeOH (15 mL) y esta disolución se lavó con NaHCO₃ sat. (20 mL). La capa acuosa se extrajo dos veces con una mezcla de CH₂Cl₂ (50 mL) y MeOH (10 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, anhidro, se filtraron y concentraron a sequedad para dar 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-(hidroxiimino)etil)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (293 mg, rendimiento de 100%) como un sólido blanquecino: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,32 - 1,43 (m, 2 H) 1,44 - 1,56 (m, 4 H) 1,76 - 1,87 (m, 2 H) 2,23 - 2,44 (m, 6 H) 3,57 - 3,67 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,04 - 4,12 (m, 2 H) 7,25 - 7,33 (m, 1 H) 7,34 - 7,46 (m, 2 H) 7,50 (m, J=7,6, 4,1 Hz, 1 H) 7,55 (d, J=7,4 Hz, 1 H) 7,81 (dd, J=8,2, 1,2 Hz, 1 H) 7,99 (d, J=1,2 Hz, 1 H) 8,36 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,07 (d, J=3,5 Hz, 1 H); MS m/z 569,2 (M+H)⁺; HPLC >95%, RT = 1,88 minutos.

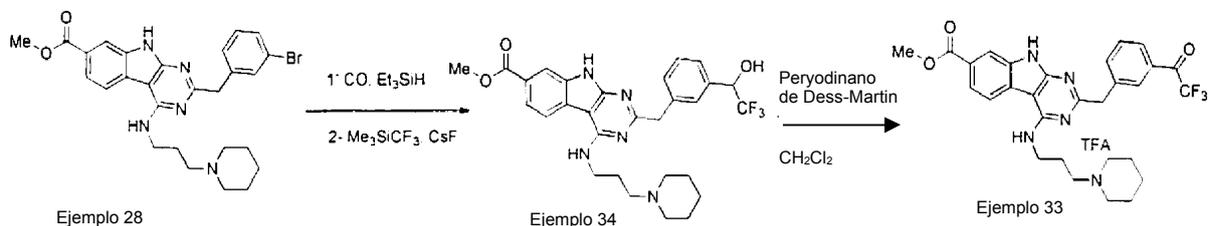
Se añadió cloruro de tosilo (0,048 g, 0,251 mmoles) en porciones a una mezcla fría de 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-(hidroxiimino)etil)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,130 g, 0,229 mmoles), 4-dimetilaminopiridina (2,79 mg, 0,023 mmoles) y trietilamina (0,038 mL, 0,274 mmoles) en DCM (10,00 mL) para dar una suspensión de color blanco. Después de una hora a temperatura ambiente, la disolución ámbar se diluyó con DCM (10 mL) y se lavó con agua (3 x 10 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro,

se filtró y se concentró a sequedad para dar 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-((tosiloxi)imino)etil)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (188 mg, rendimiento de 99%) como una espuma de color canela: MS m/z 723,2 (M+H)⁺; HPLC >89%, RT = 2,09 minutos.

A una disolución de 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-((tosiloxi)imino)etil)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,188 g, 0,260 mmoles) en DCM (5,00 mL) enfriada a -78°C, se añadió amoníaco (1,689 mL, 78 mmoles) y el tubo se selló y calentó a 20°C. La mezcla de reacción se volvió azul con el tiempo y después de 3,5 horas se enfrió nuevamente a -78°C y después se calentó lentamente a 20°C con septos + salida de nitrógeno para evaporar la mayor parte del amoníaco. Después de 3,5 horas, la mezcla de reacción se filtró sobre Buchner para separar la mayor parte del p-toluensulfonato amónico, los sólidos se lavaron con DCM (3 x 1,5 mL) y el filtrado se concentró a sequedad para dar una espuma de color amarillo que se purificó por cromatografía flash para proporcionar 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)diaziridin-3-il)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (115 mg, rendimiento de 78%) como una espuma de color blanco: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,31 - 1,43 (m, 2 H) 1,50 (quin, J=5,3 Hz, 4 H) 1,80 (dt, J=14,1, 7,0 Hz, 2 H) 2,32 (m, J=6,7, 6,7 Hz, 6 H) 3,58 - 3,67 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 3,93 (br, d, J=7,4 Hz, 1 H) 4,05 (br, d, J=8,6 Hz, 1 H) 4,07 (s, 2 H) 7,32 - 7,43 (m, 3 H) 7,47 (m, J=6,3 Hz, 1 H) 7,59 (s, 1 H) 7,81 (dd, J=8,4, 1,2 Hz, 1 H) 7,99 (d, J=1,2 Hz, 1 H) 8,35 (d, J=8,4 Hz, 1 H) 12,07 (s, 1 H); MS m/z 568,2 (M+H)⁺; HPLC >94%, RT = 1,72 minutos.

Se añadió yodo (0,028 g, 0,111 mmoles) a una mezcla de 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)diaziridin-3-il)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,060 g, 0,106 mmoles) y trietilamina (0,044 mL, 0,317 mmoles) en DCM (2 mL) para dar una disolución de color amarillo. Después de 15 minutos, el disolvente se evaporó a presión reducida para dar un residuo que se purificó por cromatografía flash para proporcionar 95 mg como una espuma de color amarillo. La espuma se disolvió en DCM (15 mL) y se lavó con NaHCO₃ sat. (10 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró a sequedad para proporcionar el compuesto del Ejemplo 25: 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)-3H-diaziridin-3-il)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (50 mg, rendimiento de 84%) como un sólido de color amarillo claro: ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,36 (m, J=5,1 Hz, 2 H) 1,48 (quin, J=5,5 Hz, 4 H) 1,76 (quin, J=7,0 Hz, 2 H) 2,30 (br, t, J=6,5, 6,5 Hz, 6 H) 3,54 - 3,67 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,09 (s, 2 H) 7,14 (d, J=7,8 Hz, 1 H) 7,26 (s, 1 H) 7,38 - 7,47 (m, 2 H) 7,52 (d, J=7,4 Hz, 1 H) 7,81 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 7,99 (s, 1 H) 8,35 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,06 (s, 1 H); HRMS m/z 566,2497 (M+H)⁺; HPLC 94,5% @ 220 nm y 92,9% @ 254 nm, RT = 2,05 minutos.

Ejemplos 33 y 34



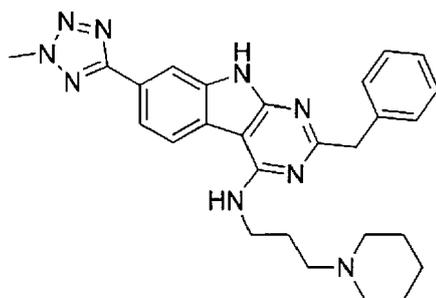
Se burbujeó CO en una disolución de 2-(3-bromobencil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (preparado como para el Ejemplo 15, 0,090 g, 0,168 mmoles), trietilsilano (0,054 mL, 0,336 mmoles) y PdCl₂ (dppf) (6,14 mg, 8,39 μmoles) y la mezcla se calentó durante la noche a 95°C. La mezcla sin purificar se purificó por HPLC preparativa para dar 44mg de producto carbonilado como un sólido: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,28 - 1,40 (m, 1 H) 1,50 - 1,72 (m, 3 H) 1,73 - 1,84 (m, 2 H) 1,95 - 2,06 (m, 2 H) 2,74 - 2,87 (m, 2 H) 3,03 - 3,12 (m, 2 H) 3,33 - 3,41 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,20 (s, 2 H) 7,46 - 7,60 (m, 2 H) 7,73 (d, J=7,83 Hz, 1 H) 7,79 (d, J=7,43 Hz, 1 H) 7,84 (dd, J=8,22, 1,57 Hz, 1 H) 7,91 (s, 1 H) 8,01 (d, J=1,17 Hz, 1 H) 8,37 (d, J=8,61 Hz, 1 H) 8,92 (br, s., 1 H) 10,00 (s, 1 H) 12,16 (s, 1 H).

Se añadió trimetil(trifluorometil)silano (0,7 mL, 3,5 mmoles) a una mezcla de 2-(3-formilbencil)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,260 g, 0,535 mmoles) y fluoruro de cesio (5,69 mg, 0,037 mmoles) enfriada a 0°C. Después de agitar durante 2 días a temperatura ambiente, se añadió HCl concentrado (0,5 mL) en 2 mL de agua y se agitó durante 15 minutos. La mezcla se diluyó con acetato de etilo, se neutralizó con Na₂CO₃ sólido, las fases se separaron y la capa acuosa se extrajo 2 veces con EA. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y el disolvente se separó para dar un residuo que se purificó por HPLC preparativa para dar 126 mg de la correspondiente sal de TFA: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,24 - 1,43 (m, 1 H) 1,49 - 1,73 (m, 4 H) 1,73 - 1,82 (m, 2 H) 1,97 - 2,07 (m, 2 H) 2,80 (q, J=11,70 Hz, 2 H) 3,02 - 3,12 (m, 2 H) 3,36 - 3,42 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,10 (s, 2 H) 5,12 (q, J=7,17 Hz, 1 H) 6,81 (br, s., 1 H) 7,30 - 7,35 (m, 2 H) 7,36 - 7,42 (m, 1 H) 7,48 - 7,58 (m, 2 H) 7,84 (dd, J=8,41, 1,37 Hz, 1 H) 8,01 (s, 1 H) 8,37 (d, J=8,61 Hz, 1 H) 8,95 (br, s., 1 H) 12,17 (s, 1 H); MS m/z 554,2 (M+H)⁺; HPLC RT 2,142 minutos.

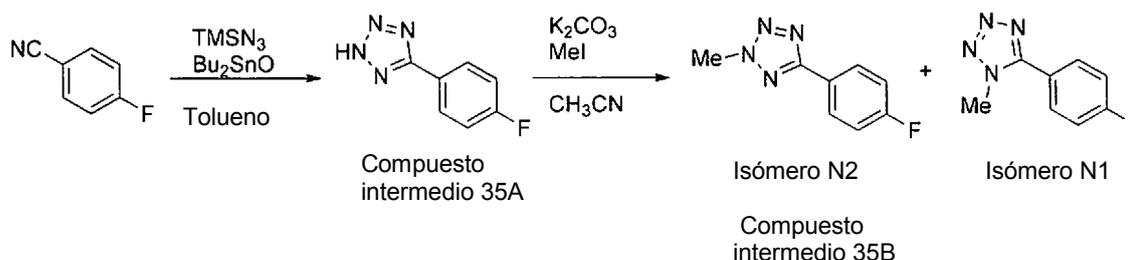
Se añadió peryodinano de Dess-Martin (56,5 mg, 0,133 mmoles) a 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxi)etil)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (20 mg, 0,036 mmoles) en DCM (753 μL)

para dar una suspensión de color blanco. Tras agitar a 20°C durante 1 hora la mezcla se purificó por cromatografía flash para dar 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoroacetil)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxylato de metilo como Ejemplo 33 (18,4 mg, rendimiento de 92%) como un sólido de color amarillo: ¹H NMR en DMSO-d₆ fue consistente con el producto deseado, pero se complicó debido a la presencia de formas hidratadas; HRMS m/z 554,2384 (M+H)⁺; HPLC >95%, RT = 1,76 y 1,87 minutos (cetona + hidrato).

Ejemplo 35



Compuesto intermedio 35B: precursor del isómero N2

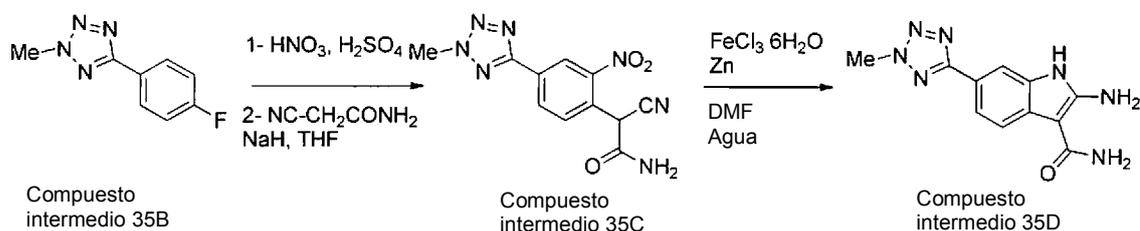


Una mezcla de 4-fluorobenzonitrilo (5 g, 41,3 mmoles), óxido de dibutilestaño (2,055 g, 8,26 mmoles), y trimetilsilil azida (8,22 mL, 61,9 mmoles) en tolueno (165 mL) se calentó a 100°C y se agitó durante 16,5 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, la capa orgánica se extrajo con NaOH 1 M (83 mL) y la capa acuosa se lavó con EtOAc (2 x 85 mL). La capa acuosa se acidificó con HCl 2 M (41,3 mL) a pH 2. La mezcla acuosa se extrajo dos veces con EtOAc (200 mL después 100 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (60 mL), se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron a sequedad para proporcionar el compuesto intermedio 35A (5-(4-fluorofenil)-2H-tetrazol, 6,61 g, rendimiento de 98%) como un sólido blanco: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 7,42 – 7,53 (m, 2 H) 8,04 – 8,14 (m, 2 H); MS m/z 165,2 (M+H)⁺; HPLC >99,5%, RT = 1,96 minutos.

Una mezcla de 5-(4-fluorofenil)-2H-tetrazol (6,61 g, 40,3 mmoles), K₂CO₃ (6,68 g, 48,3 mmoles), y yodometano (3,02 mL, 48,3 mmoles) en acetonitrilo (115 mL) se calentó a reflujo (aprox. 82°C) durante una hora. Tras enfriar, la mezcla se concentró a sequedad y el residuo se repartió entre agua (75 mL) y EtOAc (100 mL). Las capas se separaron, la capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (50 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (50 mL) y salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró para dar 9,5 g como un aceite incoloro que se solidificó al reposar. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 2 productos principales: compuesto intermedio 35B como el isómero N2: 5-(4-fluorofenil)-2-metil-2H-tetrazol (5,09 g, rendimiento de 70,9%) como un sólido blanco: ningún NOE observado entre el grupo metilo a 4,42 ppm y los protones aromáticos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4,42 (s, 3 H) 7,33 – 7,45 (m, 2 H) 8,03 – 8,14 (m, 2 H); MS m/z 179,2 (M+H)⁺; HPLC >99,5%, RT = 1,75 minutos.

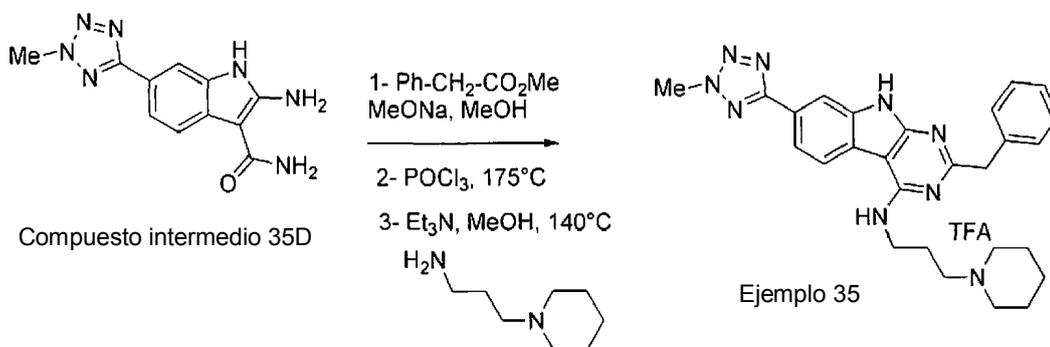
El isómero N1: 5-(4-fluorofenil)-1-metil-1H-tetrazol (1,87 g, rendimiento de 26,1%) como un sólido blanco: el NOE observado entre el grupo metilo a 4,16 ppm y los dos protones aromáticos a 7,89 – 7,97 ppm confirma la estructura; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4,16 (s, 3 H) 7,43 – 7,53 (m, 2 H) 7,89 – 7,97 (m, 2 H); MS m/z 179,2 (M+H)⁺; HPLC >99,5%, RT = 1,29 minutos.

Compuestos intermedios 35 C y D



- Una disolución de compuesto intermedio 35B (5-(4-fluorofenil)-2-metil-2H-tetrazol, 1 g, 5,61 mmoles) en ácido sulfúrico (16,45 mL, 309 mmoles) se enfrió a 0°C y después se añadió gota a gota ácido nítrico fumante (0,288 mL, 6,17 mmoles). Después de 2,5 horas, se añadió más ácido nítrico fumante (0,065 mL, 1,403 mmoles) y la mezcla se dejó calentar a 20°C. Después de 5 horas, la mezcla se vertió en una mezcla de hielo-agua 2:1 (150 mL), lo que condujo a la formación de una suspensión blanca. Después de 30 minutos, el sólido se filtró, se lavó con agua (4 x 10 mL, hasta pH neutro de los lavados), se secó a 25°C en alto vacío hasta peso constante: 5-(4-fluoro-3-nitrofenil)-2-metil-2H-tetrazol (1,16 g, rendimiento de 93%) como un sólido blanquecino: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4,47 (s, 3 H) 7,81 (dd, J=11,2, 8,8 Hz, 1 H) 8,44 (ddd, J=8,7, 4,2, 2,3 Hz, 1 H) 8,68 (dd, J=7,2, 2,2 Hz, 1 H); MS m/z 224,2 (M+H)⁺; HPLC 98,3%, RT = 1,72 minutos.
- Una disolución de 2-cianoacetamida (0,888 g, 10,56 mmoles) en DMF (2,268 mL) se añadió a una suspensión de hidruro sódico al 60% en aceite mineral (0,443 g, 11,08 mmoles) en DMF (5,67 mL) para dar una suspensión de color gris. Después de enfriar a 0°C (Nota: desprendimiento de gas hidrógeno) la mezcla resultante se agitó a 0°C durante 30 minutos. Después se añadió una disolución de 5-(4-fluoro-3-nitrofenil)-2-metil-2H-tetrazol (1,15 g, 5,15 mmoles) en DMF (2,3 mL) para dar una disolución de color púrpura intenso. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se vertió lentamente en una mezcla de hielo – agua (33,0 mL) y HCl concentrado (0,952 mL). La suspensión resultante de color amarillo se agitó durante 30 minutos, el sólido se filtró, se lavó con agua (3 x 5 mL) y después con hexano (2 x 5 mL), se secó a 40°C en alto vacío hasta peso constante para dar 2-ciano-2-(4-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-2-nitrofenil)acetamida (1,41 g, rendimiento de 95%) como un sólido de color amarillo: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4,49 (s, 3 H) 5,77 (s, 1 H) 7,77 (s, 1 H) 7,95 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 8,03 (s, 1 H) 8,51 (dd, J=8,2, 1,8 Hz, 1 H) 8,70 (d, J=1,8 Hz, 1 H); MS m/z 288,1 (M+H)⁺; HPLC 96,4% @ 220 nm, RT = 1,31 minutos.

Cloruro férrico hexahidratado (2,82 g, 10,44 mmoles) y zinc (2,276 g, 34,8 mmoles) se añadieron en porciones a una mezcla de 2-ciano-2-(4-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-2-nitrofenil)acetamida (1 g, 3,48 mmoles) en DMF (8,71 mL) y agua (8,71 mL) para dar una suspensión de color amarillo que se calentó a 100°C durante 1,25 horas. La mezcla se enfrió después a 20°C, se diluyó con MeOH (50,0 mL), se filtró sobre Celite y se concentró a presión reducida a aproximad. 20 mL (para separar la mayor parte del MeOH). Después la mezcla se diluyó con agua (50 mL) y EtOAc (100 mL), se agitó vigorosamente y se filtró. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ sat. (50 mL) y salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró para dar 489 mg como un sólido de color púrpura que se purificó por cromatografía flash para dar 2-amino-6-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-1H-indol-3-carboxamida (356 mg, rendimiento de 39,7%) como un sólido de color púrpura: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4,38 (s, 3 H) 6,57 (s, 2 H) 7,01 (s, 2 H) 7,61 - 7,69 (m, 2 H) 7,81 (s, 1 H) 10,77 (s, 1 H); MS m/z 258,2 (M+H)⁺; HPLC aprox. 78%, RT = 1,34 minutos.



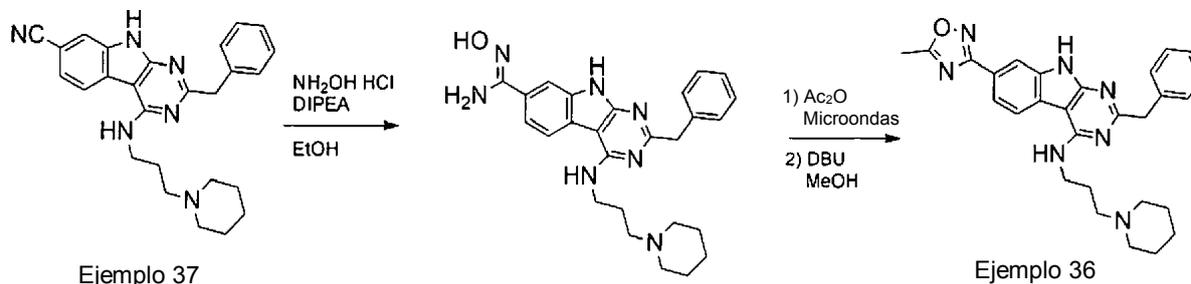
Una mezcla de compuesto intermedio 35D (2-amino-6-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-1H-indol-3-carboxamida, 0,35 g, 1,361 mmoles), 2-fenilacetato de metilo (0,288 mL, 2,041 mmoles) y metóxido sódico al 25% en peso en MeOH (0,467 mL) y metanol (3,03 mL) en un tubo de microondas se colocó en el horno de microondas y se calentó a 140°C durante una hora. Tras enfriar a temperatura ambiente y diluir con agua (1 mL) y AcOH (4 mL) la mezcla se

agitó durante 30 minutos para permitir la cristalización. El sólido se filtró, se lavó con MeOH (5 x 1 mL), se secó a 40°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar 2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-ol (220 mg, rendimiento de 45,2%) como un sólido de color marrón. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4,03 (s, 2 H) 4,43 (s, 3 H) 7,24 - 7,29 (m, 1 H) 7,34 (t, J=7,8 Hz, 2 H) 7,37 - 7,43 (m, 2 H) 7,92 (dd, J=8,0, 1,4 Hz, 1 H) 8,04 - 8,10 (m, 2 H) 12,38 (s, 1 H) 12,47 (s, 1 H); MS m/z 358,2 (M+H)⁺; HPLC 82,9%, RT = 1,89 minutos.

En un vial de microondas de 2-5 mL se añadió el producto 2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-ol sin purificar (0,220 g, 0,616 mmoles) y POCl₃ (3,90 mL, 41,9 mmoles) para dar una suspensión de color marrón. El vial se colocó en el horno de microondas y se calentó a 175°C durante 15 min., después se dejó enfriar. La mezcla de reacción se vertió después en una mezcla de agua y hielo (80 ml), se basificó a pH 8 mediante adición lenta de NaOH al 50% en peso (11 mL) y después EtOAc (80 mL). Algunos sólidos se filtraron y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (80 mL) y la capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró a sequedad para dar el correspondiente cloro-derivado: 2-bencil-4-cloro-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol (189 mg, rendimiento de 82%) como un sólido de color marrón, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4,31 (s, 2 H) 4,46 (s, 3 H) 7,20 - 7,26 (m, 1 H) 7,28 - 7,39 (m, 4 H) 8,09 (dd, J=8,2, 1,2 Hz, 1 H) 8,21 - 8,25 (m, 1 H) 8,39 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,93 (s, 1 H); MS m/z 376,2 (M+H)⁺; HPLC 95,6%, RT = 2,30 minutos.

Una mezcla de 2-bencil-4-cloro-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol preparado como se ha descrito anteriormente (0,050 mg, 0,133 mmoles) y Et₃N (0,037 mL, 0,266 mmoles) y 3-(piperidin-1-il)propan-1-amina (0,033 mL, 0,200 mmoles) en MeOH (0,6 mL) se calentó 25 minutos a 140°C en un horno de microondas. Después de enfriar y evaporar el disolvente, el residuo se purificó por HPLC de RP (fase reversa) (MeOH-agua (TFA al 0,5%) 20% a 100% de MeOH para proporcionar 55 mg del Ejemplo 35: 2,2,2-trifluoroacetato de 2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,27 - 1,41 (m, 1 H) 1,53 - 1,72 (m, 3 H) 1,79 (d, J=13,69 Hz, 2 H) 1,98 - 2,09 (m, 2 H) 2,75 - 2,87 (m, 2 H) 3,09 (dt, J=10,27, 5,23 Hz, 2 H) 3,39 (d, J=11,35 Hz, 2 H) 3,69 (q, J=5,87 Hz, 2 H) 4,09 (s, 2 H) 4,44 (s, 3 H) 7,18 - 7,24 (m, 1 H) 7,31 (t, J=7,63 Hz, 2 H) 7,35 - 7,42 (m, 2 H) 7,51 (br, s., 1 H) 7,93 (dd, J=8,22, 1,17 Hz, 1 H) 8,11 (d, J=1,17 Hz, 1 H) 8,43 (d, J=8,22 Hz, 1 H) 9,04 (br, s., 1 H) 12,15 (s, 1 H); HPLC 99% a 254 nm, Rt 2,063 minutos; HRMS m/z 482,2817 (M+H)⁺.

Ejemplo 36 (metil-oxadiazol a partir de cianuro)

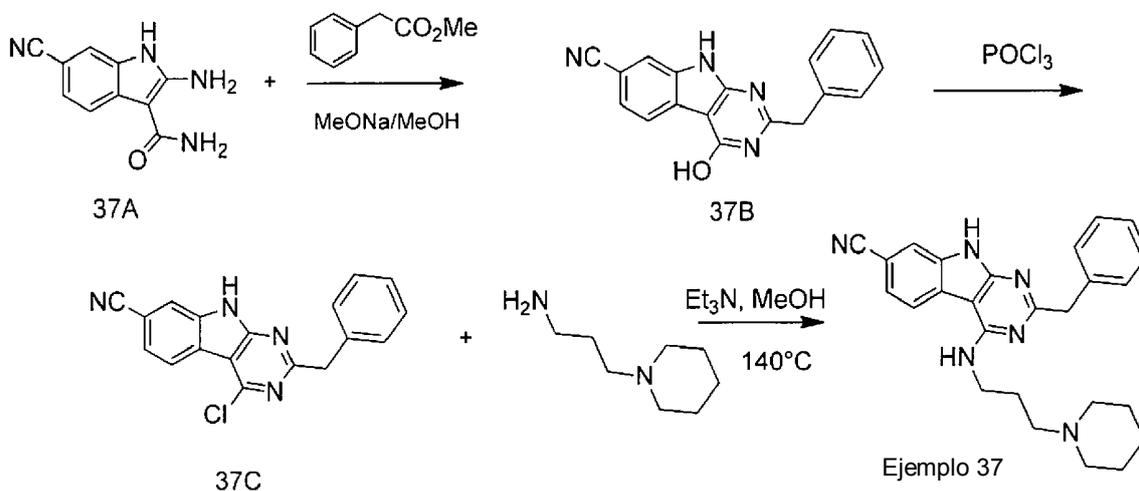


Se añadió hidrocloreto de hidroxilamina (32,7 mg, 0,471 mmoles) a una disolución del Ejemplo 37 (2-bencil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carbonitrilo, 50 mg, 0,118 mmoles) en EtOH (1,5 mL) seguido por DIPEA (84 µL, 0,483 mmoles) para dar una suspensión de color amarillo claro. Tras agitar durante 2,5 días a temperatura ambiente y 6 horas a 75°C, el disolvente se evaporó y se añadió agua (3 mL) y tras agitar durante 30 min, el sólido se recogió, se lavó con agua (3 x 1 mL) y el material sólido se secó a 35°C en alto vacío hasta peso constante para dar (Z)-2-bencil-N'-hidroxi-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboximidamida - HCl (53 mg, 0,107 mmoles, rendimiento de 91%) como un sólido de color canela; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,58 - 1,85 (m, 6 H) 1,98 - 2,10 (m, 2 H) 2,69 - 2,90 (m, 2 H) 2,94 - 3,15 (m, 2 H) 3,34 - 3,46 (m, 2 H) 3,59 - 3,74 (m, 2 H) 4,05 (s, 2 H) 5,84 (br, s., 2 H) 7,15 - 7,24 (m, 1 H) 7,29 (t, J=7,4 Hz, 3 H) 7,37 (d, J=7,4 Hz, 2 H) 7,55 (dd, J=8,2, 1,2 Hz, 1 H) 7,72 (d, J=1,2 Hz, 1 H) 8,25 (d, J=8,6 Hz, 1 H) 9,47 (d, J=7,4 Hz, 1 H) 9,56 (s, 1 H) 11,88 (s, 1 H); HRMS m/z 458,2662 (M+H)⁺, HPLC 95,4% @ 220 nm y 97,4% @ 254 nm, RT = 1,40 minutos.

Se añadió anhídrido acético (0,917 mL, 9,72 mmoles) a (Z)-2-bencil-N'-hidroxi-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboximidamida, HCl (0,040 g, 0,081 mmoles) para dar una suspensión de color canela y la mezcla se calentó mediante microondas a 140°C durante 30 minutos. El disolvente se evaporó después y el residuo se purificó por cromatografía flash para dar 36 mg (rendimiento de 85%) de 1-(2-bencil-7-(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-9-il)etanona como un sólido de color canela que se disolvió inmediatamente en metanol (2,3 mL) y se trató con DBU (0,021 mL, 0,138 mmoles). La disolución resultante de color amarillo se calentó a reflujo durante 30 minutos, después se enfrió a 0°C mientras se agitaba durante 1 hora. Los sólidos se filtraron y se lavaron con MeOH frío (2 x 0,5 mL), se secaron a 40°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar el Ejemplo 36: 2-bencil-7-(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)-N-(3-(piperidin-1-il)propil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-amina (20 mg, rendimiento de 51,3%) como un sólido de color canela: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,38 (m, J=4,7 Hz, 2 H) 1,50 (quin, J=5,5 Hz, 4 H) 1,80 (quin, J=6,9 Hz, 2 H) 2,18 - 2,45 (m, 6 H)

2,67 (s, 3 H) 3,57 - 3,70 (m, 2 H) 4,04 (s, 2 H) 7,15 - 7,22 (m, 1 H) 7,27 (m, J=7,6, 7,6 Hz, 2 H) 7,34 (t, J=5,9 Hz, 1 H) 7,36 - 7,40 (m, 2 H) 7,83 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 1 H) 8,01 (d, J=1,4 Hz, 1 H) 8,39 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,02 (br, s., 1 H); HRMS m/z 482,2663 (M+H)⁺, HPLC 99,3%, RT = 1,79 minutos.

Ejemplo 37



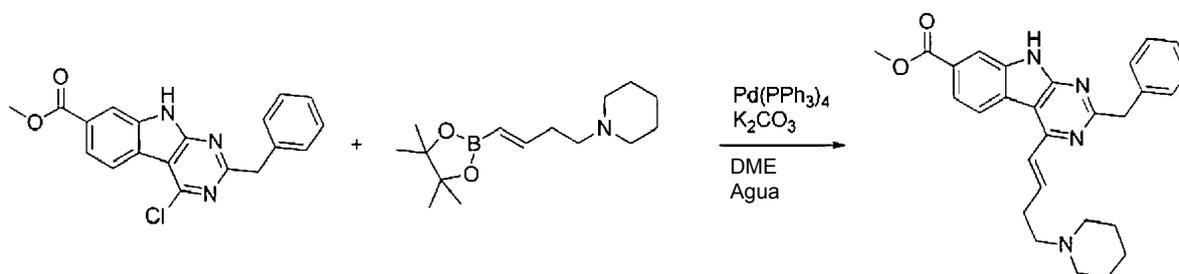
- 5 Una mezcla de color anaranjado de 2-amino-6-ciano-1H-indol-3-carboxamida (0,172 g, 0,859 mmoles), 2-fenilacetato de metilo (0,303 mL, 2,148 mmoles) y metóxido sódico al 30% en peso en MeOH (0,403 mL, 2,148 mmoles) en metanol (2,82 mL) se calentó en un tubo de microondas a 140°C durante 45 minutos. Después se añadió una nueva carga de 2-fenilacetato de metilo (0,151 mL, 1,074 mmoles) y metóxido sódico al 30% en peso en MeOH (0,201 mL, 1,074 mmoles) y el vial se colocó en el microondas y se calentó de nuevo a 140°C durante 45 minutos. Luego, después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió AcOH (0,197 mL, 3,44 mmoles) y la suspensión resultante se agitó a 20°C durante 1 hora. Los sólidos se filtraron, se lavaron con MeOH (3 x 1 mL) y se secaron a 20°C en alto vacío hasta peso constante para dar el compuesto intermedio 37B: 2-bencil-4-hidroxi-9H-pirrimido[4,5-b]indol-7-carbonitrilo (182 mg, rendimiento de 70,5%) como un sólido de color canela: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 4,03 (s, 2 H) 7,22 - 7,29 (m, 1 H) 7,30 - 7,36 (m, 2 H) 7,36 - 7,43 (m, 2 H) 7,58 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 1 H) 7,82 - 7,87 (m, 1 H) 8,05 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,59 (br, s., 2 H); MS m/z 301,2 (M+H)⁺; HPLC 94,2% @ 220 nm y 91,3% @ 254 nm; RT = 1,90 minutos.

- 20 Una mezcla de color rojo de 2-bencil-4-hidroxi-9H-pirrimido[4,5-b]indol-7-carbonitrilo (compuesto intermedio 37B, 0,180 g, 0,599 mmoles) y oxiclورو de fósforo (3,63 mL, 39,0 mmoles) se calentó a 95°C y se agitó durante 16 horas. Tras concentrar a sequedad en un rotavapor, la espuma roja oscura resultante se suspendió en NaHCO₃ sat. (10 mL) y se agitó durante 30 minutos. Los sólidos se recogieron y se lavaron con agua (3 x 1 mL), se secaron a 40°C en alto vacío hasta peso constante para dar el compuesto intermedio 37C: 2-bencil-4-cloro-9H-pirrimido[4,5-b]indol-7-carbonitrilo (190 mg, rendimiento de 99%) como un sólido de color canela que se usó directamente en la etapa siguiente: MS m/z 319,2 (M+H)⁺; HPLC 95,0% @ 220 nm y 92,3% @ 254 nm, RT = 2,28 minutos.

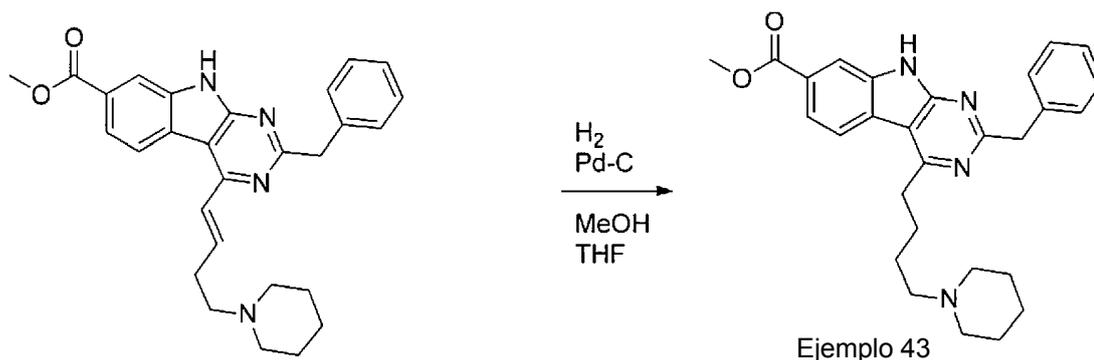
- 25 Una mezcla de 2-bencil-4-cloro-9H-pirrimido[4,5-b]indol-7-carbonitrilo (compuesto intermedio 37C, 0,190 g, 0,596 mmoles), 3-(piperidin-1-il)propan-1-amina (0,142 mL, 0,894 mmoles) y trietilamina (0,208 mL, 1,490 mmoles) en MeOH (4,50 mL) se calentó mediante microondas a 140°C durante 30 minutos. Después se concentró a sequedad para dar 346 mg de un sólido de color naranja que se purificó por cromatografía flash para dar 176 mg de un sólido de color amarillo que se suspendió en éter (7 mL) y se agitó a 20°C durante 1 hora. Los sólidos se filtraron, se lavaron con éter (3 x 1 mL) y se secaron a 30°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar 2-bencil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirrimido[4,5-b]indol-7-carbonitrilo como Ejemplo 37 (172 mg, rendimiento de 68,0%) como un sólido de color amarillo claro: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,30 - 1,43 (m, 2 H) 1,43 - 1,57 (m, 4 H) 1,80 (m, J=5,5 Hz, 2 H) 2,18 - 2,47 (m, 6 H) 3,62 (q, J=6,4 Hz, 2 H) 4,04 (s, 2 H) 7,15 - 7,22 (m, 1 H) 7,27 (m, J=7,4, 7,4 Hz, 2 H) 7,33 - 7,39 (m, 2 H) 7,47 (t, J=5,7 Hz, 1 H) 7,62 (dd, J=8,2, 1,2 Hz, 1 H) 7,79 (d, J=1,2 Hz, 1 H) 8,43 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,19 (s, 1 H); HRMS m/z 425,2448 (M+H)⁺; HPLC >99%, RT = 1,68 minutos.

35

Ejemplo 43

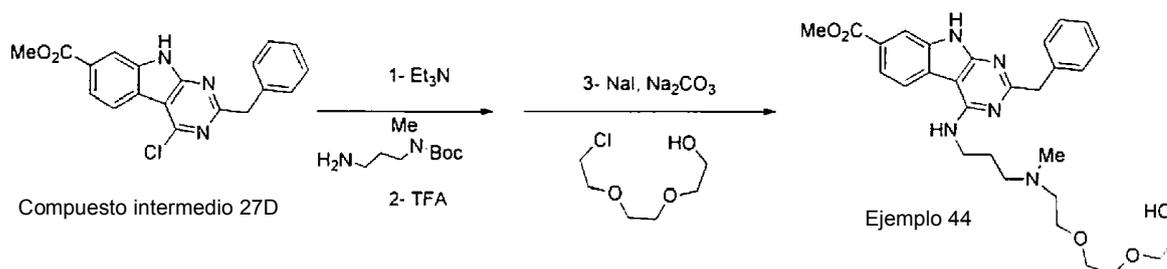


En un vial de microondas de 2-5 mL se añadió 2-bencil-4-cloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,100 g, 0,284 mmoles), (E)-1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)but-3-en-1-il)piperidina (0,113 g, 0,426 mmoles), carbonato potásico (0,106 g, 0,768 mmoles) y Pd(Ph₃P)₄ (0,05 g, 0,044 mmoles). El vial se purgó con N₂ (3 ciclos de vacío + llenado). Se añadió DME (2,84 mL) y agua (0,398 mL) y el vial se purgó con N₂ (un vacío + relleno) y después se calentó a 110°C mientras se agitaba durante 24 horas. Después de enfriar, la mezcla se concentró a sequedad a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash para dar (E)-2-bencil-4-(4-(piperidin-1-il)but-1-en-1-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (55 mg, 0,121 mmoles, rendimiento de 42,6%) como un sólido de color amarillo claro: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,41 (s, 2 H) 1,50 - 1,61 (m, 4 H) 2,30 - 2,47 (m, 4 H) 2,53 - 2,59 (m, 2 H) 2,59 - 2,70 (m, 2 H) 3,91 (s, 3 H) 4,27 (s, 2 H) 7,16 - 7,24 (m, 1 H) 7,29 (t, J=7,6 Hz, 2 H) 7,34 - 7,43 (m, 4 H) 7,88 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 1 H) 8,07 (d, J=1,4 Hz, 1 H) 8,41 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,48 (s, 1 H); HRMS m/z 455,2442 (M+H)⁺; HPLC 100% @ 220 nm y 99,4% @ 254 nm, RT = 1,84 minutos.



Una mezcla de (E)-2-bencil-4-(4-(piperidin-1-il)but-1-en-1-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (20 mg, 0,044 mmoles) y Pd-C al 10% en peso (50% húmedo) (23,41 mg) en MeOH (2 mL) y THF (2 mL) se trató con hidrógeno durante 17 horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (3 mL), se filtró, se enjuagó con MeOH (2 x 2 mL) y después con DCM (2 x 2 mL) y se concentró a sequedad para dar 19 mg como un sólido de color amarillo claro que se purificó por cromatografía flash para dar un sólido blanco (14 mg) que se trató con CH₃CN (2 mL). Después de agitar la suspensión blanca a 20°C durante 1 hora, el sólido se filtró, se lavó con CH₃CN (1 x 1 mL) y se secó a 40°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar el compuesto del Ejemplo 43 como 2-bencil-4-(4-(piperidin-1-il)butil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (14,4 mg, rendimiento de 71,7%) como un sólido blanco: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,36 (m, J=5,5 Hz, 2 H) 1,45 (quin, J=5,5 Hz, 4 H) 1,57 (quin, J=7,3 Hz, 2 H) 1,83 (dt, J=14,9, 7,4 Hz, 2 H) 2,18 - 2,31 (m, 6 H) 3,20 - 3,28 (m, 2 H) 3,91 (s, 3 H) 4,26 (s, 2 H) 7,16 - 7,22 (m, 1 H) 7,28 (t, J=7,4 Hz, 2 H) 7,32 - 7,38 (m, 2 H) 7,90 (dd, J=8,2, 1,2 Hz, 1 H) 8,09 (d, J=1,2 Hz, 1 H) 8,25 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,48 (br, s., 1 H); HRMS m/z 457,2598 (M+H)⁺; HPLC >99,5%, RT = 1,75 minutos.

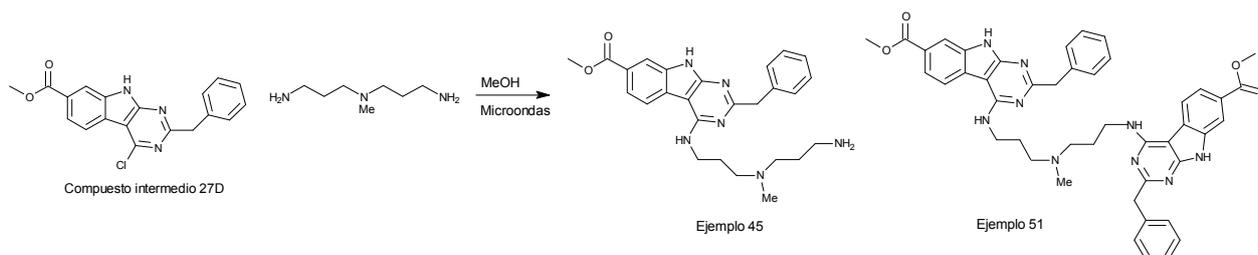
Ejemplo 44



Una mezcla de 2-bencil-4-cloro-9H-pirrido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,100 g, 0,284 mmoles), Et₃N (0,079 mL, 0,569 mmoles) y (3-aminopropil)(metil)carbamato de terc-butilo (0,080 g, 0,426 mmoles) en MeOH (1 mL) se calentó en un horno de microondas a 140°C durante 40 minutos. El disolvente se separó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash para dar 0,092 mg de derivado Boc sin purificar que se usó directamente en la etapa siguiente. Se añadió gota a gota TFA (1,0 ml, 12,98 mmoles) a una suspensión fría de 2-bencil-4-((3-((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)propil)amino)-9H-pirrido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,092 g, 0,183 mmoles) y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras diluir con tolueno, el disolvente se separó a presión reducida y después el residuo se diluyó con EtOAc para producir 85 mg de un sólido usado directamente en la etapa siguiente: HRMS m/z 404,2091 (M+H)⁺.

Una mezcla de 2,2,2-trifluoroacetato de 2-bencil-4-((3-(metilamino)propil)amino)-9H-pirido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,020 g, 0,039 mmoles), carbonato sódico (8,81 mg, 0,083 mmoles), yoduro sódico (1,448 mg, 9,66 μmoles) y 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etanol (6,46 μl, 0,044 mmoles) se calentó a 70°C en acetona (0,2 mL). Después de 15 horas, se añadió una segunda porción de reactivo 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etanol (6,46 μl, 0,044 mmoles) y la mezcla se calentó nuevamente a 70°C durante 15 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con EtOAc, se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó para dar un residuo que se purificó por cromatografía flash para proporcionar 9 mg del Ejemplo 44: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,74 - 1,85 (m, 2 H) 2,25 (br, s., 3 H) 2,55 (br, s., 2 H) 3,32 - 3,36 (m, 4 H) 3,39 - 3,46 (m, 6 H) 3,51 (t, J=5,87 Hz, 2 H) 3,64 (q, J=6,52 Hz, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,04 (s, 2 H) 4,53 (br, s., 1 H) 7,18 (t, J=7,40 Hz, 1 H) 7,28 (t, J=7,63 Hz, 2 H) 7,37 (d, J=7,04 Hz, 2 H) 7,55 (t, J=5,28 Hz, 1 H) 7,82 (dd, J=8,22, 1,17 Hz, 1 H) 7,99 (s, 1 H) 8,27 (d, J=8,22 Hz, 1 H) 12,05 (s, 1 H); HRMS m/z 536,2855 (M+H)⁺; RT de HPLC 2,035 minutos.

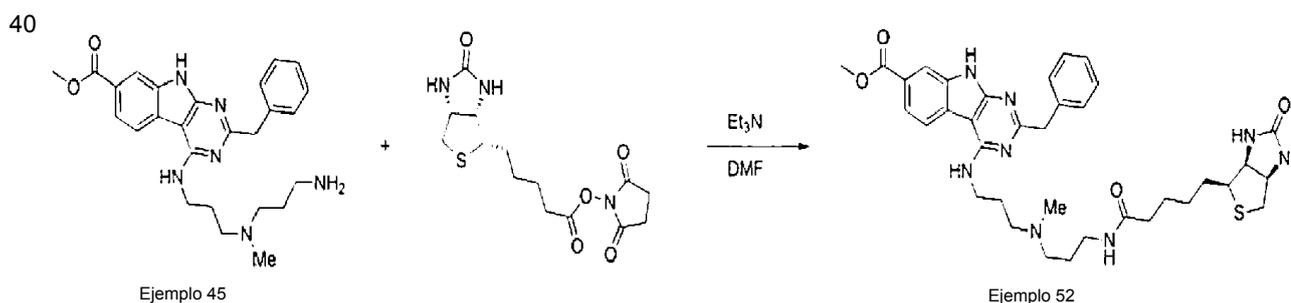
Ejemplos 45 y 51



En un vial de microondas de 2-5 mL se añadió 2-bencil-4-cloro-9H-pirido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,050 g, 0,142 mmoles) y N1-(3-aminopropil)-N1-metilpropano-1,3-diamina (0,115 mL, 0,711 mmoles) en MeOH (2,000 mL, 49,4 mmoles) para dar una suspensión de color canela. El vial se colocó en el microondas y se calentó a 140°C durante 30 minutos. Después de 30 minutos, la mezcla se concentró a sequedad en un rotavapor y el residuo se purificó por cromatografía flash y se liofilizó en CH₃CN para proporcionar dos productos distintos: Ejemplo 45 como el producto mono-N-alkilado: 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-bencil-9H-pirido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (44 mg, rendimiento de 67,2%) como un sólido blanco; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,44 (dt, J=13,8, 6,6 Hz, 2 H) 1,72 (dt, J=13,7, 6,8 Hz, 2 H) 2,11 (s, 3 H) 2,24 - 2,30 (m, 2 H) 2,33 (t, J=6,7 Hz, 2 H) 2,47 (br, s., 2 H) 3,51 - 3,61 (m, 2 H) 3,76 - 3,85 (m, 3 H) 3,97 (s, 2 H) 7,08 - 7,15 (m, 1 H) 7,17 - 7,24 (m, 2 H) 7,27 - 7,34 (m, 2 H) 7,50 (t, J=5,3 Hz, 1 H) 7,76 (dd, J=8,2, 1,6 Hz, 1 H) 7,92 (d, J=1,6 Hz, 1 H) 8,20 (d, J=8,2 Hz, 1 H); MS m/z 461,2 (M+H)⁺; HPLC >99%, RT = 1,63 minutos.

Ejemplo 51 como un producto bis-alkilado: 4,4'-(((metilazanediil)bis(propan-3,1-diil)bis(azanediil)bis(2-bencil-9H-pirido[4,5-b]indol-7-carboxilato) de dimetilo (3,7 mg, rendimiento de 6,71%) como un sólido de color amarillo claro: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,18 - 1,29 (m, 4 H) 1,79 - 1,91 (m, 4 H) 2,25 (s, 3 H) 3,58 - 3,71 (m, 4 H) 3,84 (s, 6 H) 3,97 (s, 4 H) 7,07 - 7,16 (m, 2H) 7,22 (t, J=7,4 Hz, 4 H) 7,29 - 7,34 (m, 4 H) 7,53 (t, J=5,3 Hz, 2 H) 7,77 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 2 H) 7,96 (d, J=1,4 Hz, 2 H) 8,22 (d, J=8,2 Hz, 2 H) 12,01 (s, 2H); MS m/z 776,3 (M+H)⁺; HPLC 94,6% @ 220 nm y 93,8% @ 254 nm, RT = 2,01 minutos.

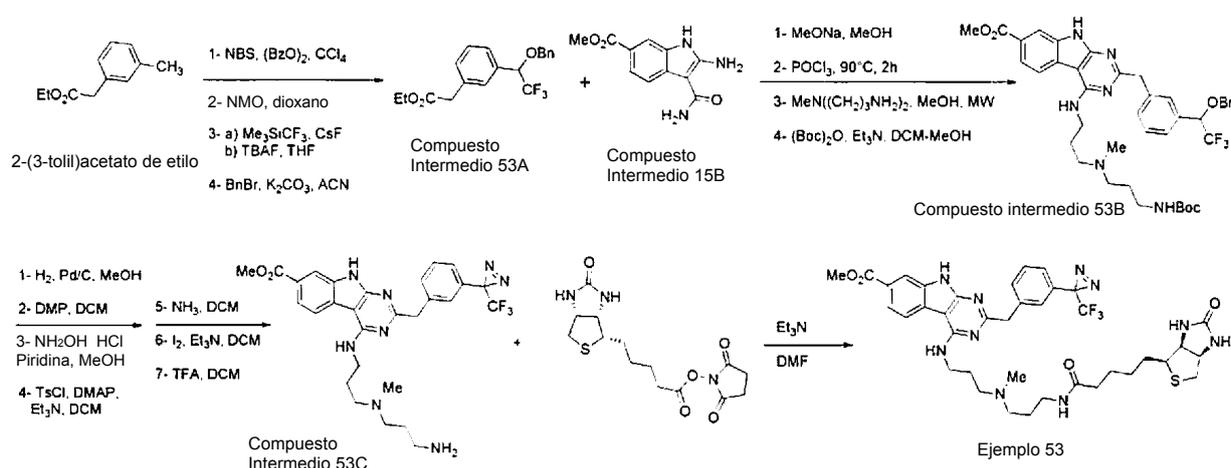
Ejemplo 52



Se añadió 2,5-dioxopirrolidin-1-il-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato (12,01 mg, 0,035 mmoles) a una disolución de 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-bencil-9H-pirrido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (Ejemplo 45, 15 mg, 0,033 mmoles) y trietilamina (6,81 μ L, 0,049 mmoles) en DMF (750 μ L, 9,69 mmoles) para dar una disolución de color amarillo claro. Después de agitar a 20°C durante 1 hora, la mezcla se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía flash para dar una espuma de color amarillo claro. La espuma se suspendió en Et₂O (1 mL) y se agitó durante 30 minutos y el sólido se recogió, se lavó con Et₂O (2 x 0,5 mL) y se secó a 20°C en alto vacío hasta peso constante para dar el compuesto del Ejemplo 52: 2-bencil-4-((3-(metil(3-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)propil)amino)propil)amino)-9H-pirrido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (17 mg, rendimiento de 76%) como un sólido de color amarillo claro: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,17 - 1,34 (m, 3 H) 1,36 - 1,51 (m, 2 H) 1,51 - 1,64 (m, 3 H) 1,78 (dt, J=13,5, 6,6 Hz, 2 H) 2,02 (t, J=7,4 Hz, 2 H) 2,17 (s, 3 H) 2,32 (t, J=7,0 Hz, 2 H) 2,40 (t, J=6,7 Hz, 2 H) 2,55 (d, J=12,3 Hz, 1 H) 2,77 (dd, J=12,3, 5,1 Hz, 1 H) 2,99 - 3,11 (m, 3 H) 3,58 - 3,68 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,04 (s, 2 H) 4,08 (m, J=4,9, 4,9, 2,3 Hz, 1 H) 4,26 (dd, J=7,6, 5,3 Hz, 1 H) 6,34 (s, 1 H) 6,40 (s, 1 H) 7,14 - 7,22 (m, 1 H) 7,27 (t, J=7,4 Hz, 2H) 7,37 (d, J=7,0 Hz, 2 H) 7,54 (t, J=5,5 Hz, 1 H) 7,74 (t, J=5,5 Hz, 1 H) 7,82 (dd, J=8,2, 1,6 Hz, 1 H) 7,99 (d, J=1,6 Hz, 1 H) 8,27 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,05 (s, 1 H); MS m/z 687,3 (M+H)⁺; HPLC >99,5%, RT = 1,70 minutos.

Ejemplo 53

El compuesto intermedio 53A se preparó a partir de 2-(3-tolil)acetato de etilo comercial. Se convirtió después en el compuesto intermedio 53B como se describe para los Ejemplos 15, 45 y 47. Después, la parte de azirina se desarrolló de acuerdo con la descripción proporcionada para el Ejemplo 25. La última etapa se basó en el Ejemplo 52.



Una mezcla de 2-(m-tolil)acetato de etilo (4,8 g, 26,9 mmoles), NBS (5,27 g, 29,6 mmoles) y peróxido de benzoilo (0,110 g, 0,454 mmoles) se llevó a reflujo en CCl₄ (28 mL). Después de 5 horas, la reacción se enfrió a 5°C, se filtró y el disolvente se separó. La purificación mediante cromatografía flash usando acetato de etilo-hexano dio 3,8 g del correspondiente derivado de bromobencilo: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,19 (t, J=6,70 Hz, 3 H) 3,67 (s, 2 H) 4,09 (q, J=6,70 Hz, 2 H) 4,69 (s, 2 H) 7,15 - 7,25 (m, 1 H) 7,27 - 7,42 (m, 3 H); este material se usó directamente en la siguiente etapa.

Una mezcla de 2-(3-(bromometil)fenil)acetato de etilo (8,11 g, 31,5 mmoles) y 4-óxido de 4-metilmorfolina hidratado (5,54 g, 47,3 mmoles) en 1,4-dioxano (110 mL) se calentó a 100°C durante 1,5 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el volumen de disolvente se redujo a la mitad y después se diluyó con Et₂O:EtOAc (1:1, 120 mL), se lavó con agua (50 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (60 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 50 mL) y después con salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró para dar 4,72 g de un aceite de color amarillo claro que se purificó mediante cromatografía flash para proporcionar 2-(3-formilfenil)acetato (2,91 g, rendimiento de 48%) como un aceite de color amarillo claro: ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,19 (t, J=7,0 Hz, 3 H) 3,81 (s, 2 H) 4,09 (q, J=7,0 Hz, 2 H) 7,52 - 7,65 (m, 2 H) 7,79 - 7,85 (m, 2 H) 10,00 (s, 1 H); MS m/z 207,2 (M+H)⁺; HPLC 99%, RT = 1,67 minutos.

Se añadió trimetil(trifluorometil)silano (3,13 mL, 21,20 mmoles) a una mezcla de 2-(3-formilfenil)acetato de etilo (2,91 g, 15,14 mmoles) y fluoruro de cesio (0,161 g, 1,060 mmoles) en DMF (20,19 mL), se enfrió a 0 - 5°C. Después de agitar durante 1,5 horas, se añadió una disolución de TBAF 1 M en THF (15,14 mL). La disolución resultante de color amarillo se agitó a 0 - 5°C y después de 30 minutos la mezcla se vertió en agua (150 mL) y se extrajo con MTBE (1 x 150 mL, después 2 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1 x 150 mL después 1 x 100 mL) y con salmuera (100 mL) y después la capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró para dar 3,84 g como un aceite de color naranja claro que se purificó por cromatografía flash para dar 2-

(3-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil)fenil)acetato de etilo (663 mg, rendimiento de 16%) como un aceite incoloro: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,17 (t, $J=7,0$ Hz, 3 H) 3,68 (s, 2 H) 4,08 (q, $J=7,0$ Hz, 2 H) 5,13 (q, $J=7,4$ Hz, 1 H) 6,82 (s, 1 H) 7,24 - 7,31 (m, 1 H) 7,37 (t, $J=7,2$ Hz, 3 H); MS m/z 263,1 (M+H) $^+$; HPLC 93,7% @ 220 nm, RT = 1,82 minutos.

- 5 Se añadió bromuro de bencilo (0,330 mL, 2,78 mmoles) a una mezcla de 2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil)fenil)acetato de etilo (0,648 g, 2,471 mmoles) y K_2CO_3 (1,059 g, 7,66 mmoles) en acetonitrilo (17,00 mL) y la mezcla se agitó mientras se calentaba a reflujo (75 - 80°C) durante 24 hours. Después de enfriar y concentrar a sequedad, el residuo se purificó por cromatografía flash para dar el compuesto intermedio 53A: 2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)acetato de etilo (686 mg, rendimiento de 79%) como un aceite incoloro: MS m/z 353,2 (M+H) $^+$; HPLC 99,7%, RT = 2,19 minutos.

- 15 Una mezcla de compuesto intermedio 15B (0,310 g, 1,329 mmoles), 2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)acetato de etilo (0,679 g, 1,927 mmoles) y compuesto intermedio 53A y metóxido sódico al 30% en peso en MeOH (0,524 mL) en metanol (3,23 mL) para dar una suspensión clara de color marrón que se calentó en un aparato de microondas a 140°C durante 1 hora. Tras enfriar y diluir con MeOH (0,75 mL) y AcOH (0,167 mL, 2,92 mmoles), la suspensión resultante se agitó a 20°C durante 2 horas. Después se recogió el sólido y se lavó con MeOH (4 x 0,5 mL), después se secó a 40°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar 2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)-4-hidroxi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (399 mg, rendimiento de 57,6%) como un sólido de color canela: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,87 (s, 3 H) 4,09 (s, 2 H) 4,45 - 4,57 (m, 2 H) 5,23 (q, $J=7,2$ Hz, 1 H) 7,20 - 7,29 (m, 5 H) 7,36 - 7,51 (m, 3 H) 7,52 (s, 1 H) 7,84 (dd, $J=8,2, 1,4$ Hz, 1 H) 8,01 (d, $J=1,4$ Hz, 1 H) 8,03 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 12,46 (br, s., 1 H) 12,56 (br, s., 1 H); MS m/z 522,2 (M+H) $^+$; HPLC 92,7% @ 220 nm y 91,7% @ 254 nm, RT = 2,20 minutos.

- 25 Una mezcla de 2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)-4-hidroxi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,395 g, 0,757 mmoles) en oxidloruro de fósforo (6 mL, 64,4 mmoles) se calentó a 90°C durante 2 horas, después tras enfriar se concentró a sequedad para dar 650 mg como una espuma de color marrón que se suspendió en NaHCO_3 sat. (15 mL) y se agitó durante 1 hora. El sólido se filtró, se lavó con agua (3 x 2 mL) y se secó a 40°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar 2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)-4-cloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (375 mg, rendimiento de 92%) como un sólido de color canela y se usó como tal en la etapa siguiente: MS m/z 540,2 (M+H) $^+$; HPLC 92%, RT 2,51 minutos.

- 30 Una mezcla de 2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)-4-cloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,375 g, 0,695 mmoles) y N1-(3-aminopropil)-N1-metilpropano-1,3-diamina (0,784 mL, 4,86 mmoles) en MeOH (9,83 mL, 243 mmoles) se calentó en un horno de microondas a 140°C durante 30 minutos. Luego, después de concentrar a sequedad a presión reducida el aceite de color marrón resultante se purificó por cromatografía flash para proporcionar 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (288 mg, rendimiento de 63,9%) como una espuma de color amarillo: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,48 (dt, $J=14,0, 6,9$ Hz, 2 H) 1,75 (quin, $J=6,7$ Hz, 2 H) 2,14 (s, 3 H) 2,24 - 2,42 (m, 4 H) 2,52 - 2,60 (m, 2 H) 3,61 (q, $J=6,3$ Hz, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,10 (s, 2 H) 4,49 (s, 2 H) 5,17 (q, $J=7,0$ Hz, 1 H) 7,18 - 7,30 (m, 5 H) 7,31 - 7,36 (m, 1 H) 7,39 (t, $J=7,6$ Hz, 1 H) 7,44 - 7,53 (m, 2 H) 7,58 (t, $J=5,3$ Hz, 1 H) 7,84 (dd, $J=8,2, 1,4$ Hz, 1 H) 8,00 (d, $J=1,4$ Hz, 1 H) 8,28 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H); MS m/z 649,3 (M+H) $^+$; HPLC 97,6% @ 220 nm and 95,5% @ 254 nm, RT = 1,96 minutos.

- 40 Una disolución de dicarbonato de di-terc-butilo (0,124 mL, 0,533 mmoles) en DCM (1 mL) se añadió lentamente a una mezcla de 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,288 g, 0,444 mmoles) y trietilamina (0,074 mL, 0,533 mmoles) en DCM (3 mL) y MeOH (2 mL) para dar una disolución de color amarillo. Después de agitar a 20°C durante 45 minutos, la disolución se concentró a sequedad para dar 373 mg como una espuma de color amarillo que se purificó por cromatografía flash para proporcionar el compuesto intermedio 53B como 2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)-4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (306 mg, rendimiento de 92%) como una espuma de color amarillo: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,33 (s, 9 H) 1,52 (dt, $J=14,1, 7,0$ Hz, 2 H) 1,67 - 1,81 (m, 2 H) 2,12 (s, 3 H) 2,28 (t, $J=7,2$ Hz, 2 H) 2,34 (t, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,92 (q, $J=6,7$ Hz, 2 H) 3,54 - 3,67 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,10 (s, 2 H) 4,49 (s, 2 H) 5,17 (q, $J=6,8$ Hz, 1 H) 6,76 (t, $J=5,5$ Hz, 1 H) 7,16 - 7,30 (m, 5 H) 7,31 - 7,36 (m, 1 H) 7,39 (t, $J=7,6$ Hz, 1 H) 7,43 - 7,51 (m, 2 H) 7,53 (t, $J=5,3$ Hz, 1 H) 7,83 (dd, $J=8,4, 1,4$ Hz, 1 H) 8,00 (d, $J=1,4$ Hz, 1 H) 8,27 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 12,06 (s, 1 H); MS m/z 749,3 (M+H) $^+$; HPLC 97,7%, RT = 2,06 minutos.

- 55 Una mezcla de 2-(3-(1-(benciloxi)-2,2,2-trifluoroetil)fenil)-4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,306 g, 0,409 mmoles) y Pd-C al 10% en peso (50% húmedo) (0,304 g, 0,143 mmoles) en MeOH (9,92 mL) se trató con hidrógeno a 20°C durante 22 horas. Después, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite, la torta se enjuagó con MeOH (2 x 10 mL) y con DCM:MeOH (1:1, 2 x 10 mL), después se concentró a sequedad en rotavapor para dar 226 mg de un aceite que se purificó mediante cromatografía flash para proporcionar 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil)fenil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (202 mg, rendimiento de 75%) como una espuma blanca: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,33 (s, 9 H) 1,48 - 1,62 (m, 2 H) 1,71 - 1,85 (m, 2 H) 2,16 (s, 3 H) 2,25 - 2,35 (m, 2 H) 2,39 (t, $J=6,8$ Hz, 2

H) 2,86 - 3,00 (m, 2 H) 3,56 - 3,70 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,06 (s, 2 H) 5,01 - 5,14 (m, 1 H) 6,77 (m, J=6,3 Hz, 2 H) 7,30 (d, J=4,7 Hz, 2 H) 7,36 - 7,42 (m, 1 H) 7,49 (s, 1 H) 7,51 - 7,57 (m, 1 H) 7,82 (dd, J=8,2, 1,2 Hz, 1 H) 7,99 (d, J=1,2 Hz, 1 H) 8,26 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,06 (br, s., 1 H); MS m/z 659,2 (M+H)⁺; HPLC >97%, RT = 1,90 minutos.

5 Una mezcla de 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,200 g, 0,304 mmoles) y reactivo peryodinano de Dess-Martin (0,567 g, 1,336 mmoles) en DCM (7,50 mL) se agitó a 20°C durante una hora. Tras evaporar a sequedad, el residuo se purificó mediante cromatografía flash para proporcionar 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoroacetil)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (181 mg, rendimiento de 91%) como una espuma de color amarillo: ¹H NMR en DMSO-d₆ es consistente con el producto deseado, pero complicada debido a la presencia de una forma de hidrato: MS m/z 657,3 (M+H)⁺; HPLC 96,0% @ 220 nm y 95,3% @ 254 nm, RT 1,87 y 1,96 (cetona + hidrato) minutos.

15 Una mezcla de 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoroacetil)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,180 g, 0,274 mmoles), hidrocloreto de hidroxilamina (0,023 g, 0,329 mmoles) y piridina (0,355 mL) en MeOH (1,9 mL) se calentó en un horno de microondas a 65°C durante 48 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a sequedad, una disolución del residuo se lavó con NaHCO₃ sat. (15 mL), la capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad para proporcionar 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-(hidroxiimino)etil)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (184 mg, rendimiento de 100%) como una espuma de color amarillo claro: MS m/z 672,3 (M+H)⁺; HPLC 96,0% @ 220 nm y 91,4% @ 254 nm, RT = 2,01 minutos.

20 Se añadió en porciones Ts-Cl (0,060 g, 0,315 mmoles) a una mezcla de 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-(hidroxiimino)etil)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,184 g, 0,274 mmoles), DMAP (3,35 mg, 0,027 mmoles) y trietilamina (0,048 mL, 0,342 mmoles) en DCM (12 mL) para dar una disolución de color canela. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se diluyó con DCM (12 mL), se lavó con agua (3 x 12 mL) y la capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad para proporcionar 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-((tosiloxi)imino)etil)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (217 mg, rendimiento de 96%) como una espuma de color canela: MS m/z 826,2 (M+H)⁺; HPLC 93,2% @ 220 nm y 91,3% @ 254 nm, RT = 2,20 minutos.

30 Una disolución de 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(2,2,2-trifluoro-1-((tosiloxi)imino)etil)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,217 g, 0,263 mmoles) en DCM (5,07 mL) se enfrió a -78°C y se condensó amoníaco (1,7 mL, 79 mmoles) en el tubo sellado. La mezcla se dejó calentar lentamente a 20°C y se agitó durante 3 horas. Tras enfriar nuevamente a -78°C, el tubo sellado se ajustó con un septo con salida de gas y se calentó lentamente a 20°C para evaporar el amoníaco. Después de 3 horas, la mezcla se concentró a sequedad y después se purificó mediante cromatografía flash para proporcionar 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)diaziridin-3-il)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (139 mg, rendimiento de 79%) como una espuma blanca: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,34 (s, 9 H) 1,52 - 1,62 (m, 2 H) 1,72 - 1,89 (m, 2 H) 2,08 - 2,25 (m, 3 H) 2,30 - 2,44 (m, 4 H) 2,94 (q, J=6,4 Hz, 2 H) 3,64 (q, J=6,5 Hz, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 3,93 (d, J=8,4 Hz, 1 H) 4,04 (d, J=8,4 Hz, 1 H) 4,08 (s, 2 H) 6,78 (br, s., 1 H) 7,31 - 7,41 (m, 2 H) 7,44 - 7,50 (m, 1 H) 7,54 (t, J=5,5 Hz, 1 H) 7,59 (s, 1 H) 7,83 (dd, J=8,4, 1,4 Hz, 1 H) 7,99 (d, J=1,4 Hz, 1 H) 8,27 (d, J=8,4 Hz, 1 H) 12,07 (s, 1 H); MS m/z 671,4 (M+H)⁺; HPLC 98,6% @ 220 nm y 96,4% @ 254 nm, RT = 1,91 minutos.

45 Se añadió yodo (27,8 mg, 0,110 mmoles) a un matraz de fondo redondo de 5 mL protegido de la luz y precargado con 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)diaziridin-3-il)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (70 mg, 0,104 mmoles) y trietilamina (43,6 µL, 0,313 mmoles) en DCM (2 mL) para dar una disolución de color amarillo claro. Tras agitar a 20°C durante 15 minutos, el disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía flash para dar 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)-3H-diazirin-3-il)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (65 mg, 0,097 mmoles, rendimiento de 93 %) como una espuma de color amarillo claro: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,33 (s, 9 H) 1,53 (dt, J=13,8, 7,0 Hz, 2 H) 1,70 - 1,82 (m, 2 H) 2,15 (br, s., 3 H) 2,24 - 2,34 (m, 2 H) 2,34 - 2,42 (m, 2 H) 2,87 - 2,98 (m, 2 H) 3,55 - 3,66 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,10 (s, 2 H) 6,76 (br, s., 1 H) 7,14 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 7,27 (s, 1 H) 7,43 (t, J=7,8 Hz, 1 H) 7,49 - 7,58 (m, 2 H) 7,83 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 1 H) 7,99 (d, J=1,4 Hz, 1 H) 8,27 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,06 (s, 1 H); MS m/z 669,2 (M+H)⁺; HPLC 97,6% @ 220 nm y 97,3% @ 254 nm, RT = 2,18 minutos.

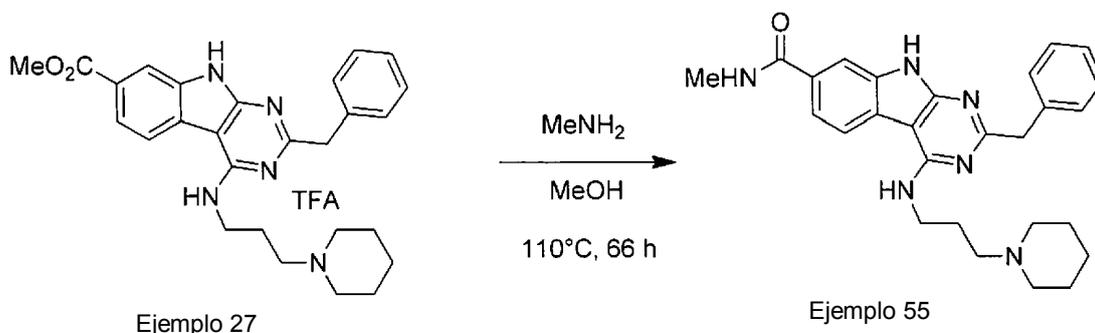
55 Se añadió ácido trifluoroacético (0,400 mL, 5,19 mmoles) a una disolución de 4-((3-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)-3H-diazirin-3-il)encil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,064 g, 0,096 mmoles) en DCM (4 mL) para dar una disolución de color amarillo claro. Tras agitar a 20°C durante 30 minutos, la mezcla de reacción se diluyó con DCM (15 mL), se lavó con NaHCO₃ sat. (10 mL) y la capa acuosa se extrajo de nuevo con DCM (10 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad para proporcionar el compuesto intermedio 53C: 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)-3H-diazirin-3-il)encil)-9H-pirimido[4,5-

60

b]indol-7-carboxilato de metilo (45 mg, rendimiento de 83%) como una espuma de color amarillo claro: HRMS m/z 569,2601 (M+H)⁺; HPLC 97,1% @ 220 nm y 96,9% @ 254 nm, RT = 1,96 minutos.

Se añadió 2,5-dioxopirrolidin-1-il-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato (29,2 mg, 0,085 mmoles) a una mezcla de 4-((3-((3-aminopropil)(metil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)-3H-diazirin-3-il)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (45 mg, 0,079 mmoles) y trietilamina (16,55 µL, 0,119 mmoles) en DMF (750 µL) para dar una disolución de color amarillo. Tras agitar a 20°C durante 30 minutos, la mezcla de reacción se concentró a un aceite de color anaranjado claro en alto vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía flash para dar 56 mg como un sólido blanco que se liofilizó en CH₃CN para proporcionar el compuesto del Ejemplo 53: 4-((3-(metil(3-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)propil)amino)propil)amino)-2-(3-(3-(trifluorometil)-3H-diazirin-3-il)bencil)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (51 mg, 0,064 mmoles, rendimiento de 81%) como un sólido blanco: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,18 - 1,34 (m, 3 H) 1,35 - 1,50 (m, 3 H) 1,50 - 1,64 (m, 3 H) 1,70 - 1,82 (m, 2 H) 2,02 (t, J=7,4 Hz, 2 H) 2,15 (s, 3 H) 2,26 - 2,34 (m, 2 H) 2,37 (t, J=6,7 Hz, 2 H) 2,55 (d, J=12,5 Hz, 1 H) 2,77 (dd, J=12,1, 5,1 Hz, 1 H) 2,99 - 3,10 (m, 3 H) 3,56 - 3,66 (m, 2 H) 3,88 (s, 3 H) 4,03 - 4,14 (m, 1 H) 4,10 (s, 2 H) 4,26 (dd, J=7,6, 5,3 Hz, 1 H) 6,34 (s, 1 H) 6,39 (s, 1 H) 7,14 (d, J=7,4 Hz, 1 H) 7,28 (s, 1 H) 7,44 (t, J=7,8 Hz, 1 H) 7,52 (d, J=7,8 Hz, 1 H) 7,56 (t, J=5,3 Hz, 1 H) 7,73 (t, J=5,5 Hz, 1 H) 7,83 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 1 H) 8,00 (d, J=1,4 Hz, 1 H) 8,28 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 12,07 (s, 1 H); HRMS m/z 795,3368 (M+H)⁺; HPLC 95,4% @ 220 nm y 96,2% @ 254 nm, RT = 2,06 minutos.

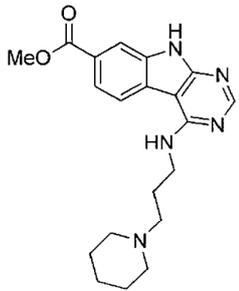
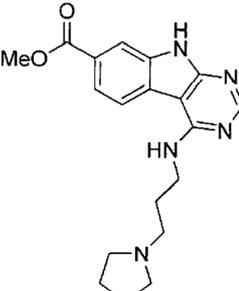
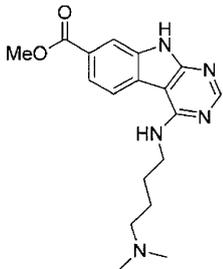
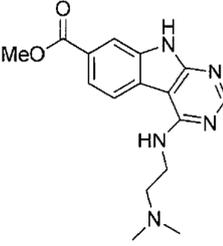
Ejemplo 55



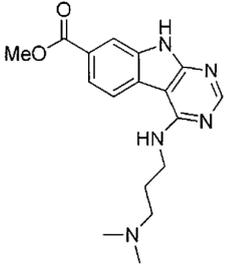
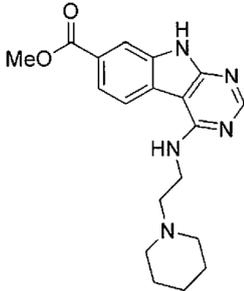
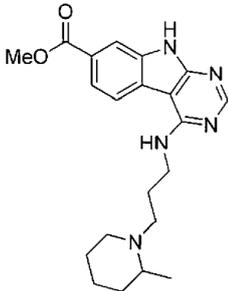
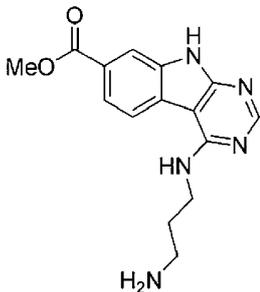
Una disolución de 2-bencil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (Ejemplo 27, 0,030 g, 0,066 mmoles) en metilamina 2 M en MeOH (10,00 mL) se colocó en un tubo sellado y se calentó a 110°C durante 66 horas, después la mezcla se enfrió a 20°C, se concentró a sequedad y se purificó mediante cromatografía flash para proporcionar 28 mg de un aceite incoloro que se suspendió en éter (2 mL). Después de agitar la suspensión resultante durante 2 horas, los sólidos se recogieron en un Buchner, la torta se lavó con éter (2 x 0,5 mL) y el producto se secó a 40°C en alto vacío hasta peso constante para proporcionar el Ejemplo 55: 2-bencil-N-metil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxamida (23 mg, rendimiento de 77 %) como un sólido blanco: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,38 (m, J=5,1 Hz, 2 H) 1,50 (quin, J=5,5 Hz, 4 H) 1,80 (quin, J=7,0 Hz, 2 H) 2,22 - 2,41 (m, 6 H) 2,81 (d, J=4,3 Hz, 3 H) 3,58 - 3,68 (m, 2 H) 4,03 (s, 2 H) 7,15 - 7,21 (m, 1 H) 7,27 (m, J=7,4, 7,4 Hz, 3 H) 7,34 - 7,40 (m, 2 H) 7,70 (dd, J=8,2, 1,4 Hz, 1 H) 7,90 (d, J=1,4 Hz, 1 H) 8,27 (d, J=8,2 Hz, 1 H) 8,46 (q, J=4,3 Hz, 1 H) 11,96 (s, 1 H); HRMS m/z 457,2708 (M+H)⁺; HPLC >99,5% @ 220 nm y 98,9% @ 254 nm, RT = 1,53 minutos.

El tiempo de retención de HPLC indicado es para HPLC de fase reversa (Agilent, serie 1200) usando las siguientes condiciones. Disolvente A: MeOH:H₂O:TFA (5:95:0,05); disolvente B: MeOH:H₂O:TFA (95:5:0,05); caudal: 3,0 mL/min.; gradiente de 0 a 100% de B en 2,0 min.; columna: ZorbaxC18, 3,5 micrómetros, 4,6 x 30 mm; longitud de onda 220 nm.

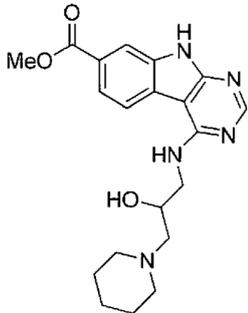
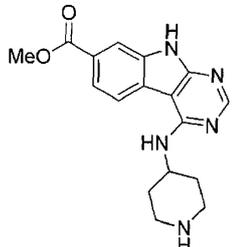
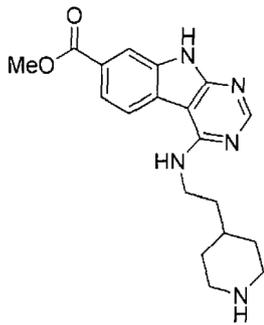
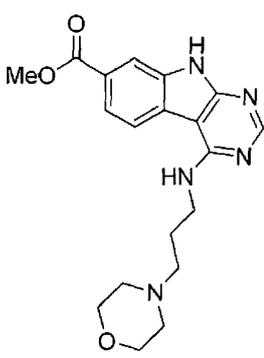
Tabla 1. Estructura, tiempo de retención en HPLC analítica, datos de LCMS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) y datos biológicos de los Ejemplos.

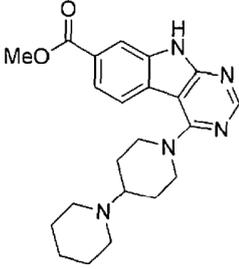
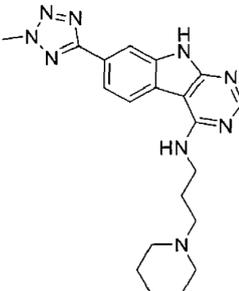
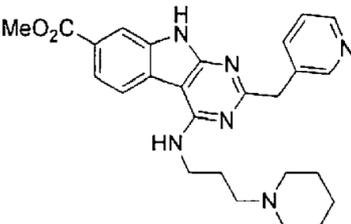
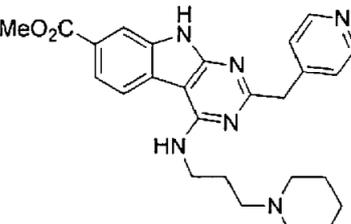
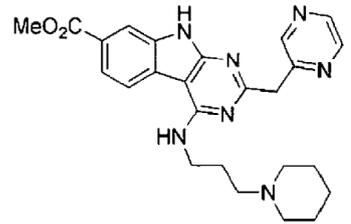
Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
1		1,38	368,2	C
2		1,35	354,2	D
3		1,55	342,2	C
4		1,30	314,2	D
5		1,29	328,2	B

ES 2 733 946 T3

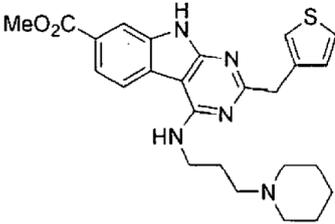
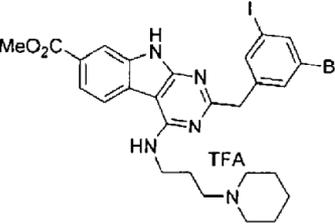
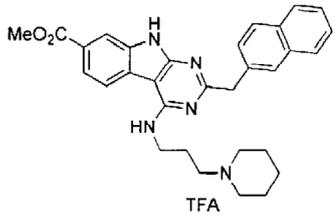
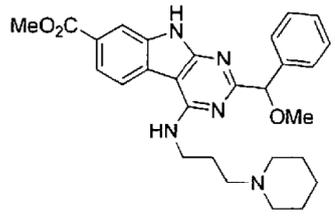
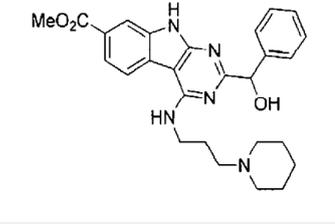
Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
				
6		1,41	354,2	C
7		1,43	382,2	D
8		1,34	300,2	C
9		1,35	384,2	C

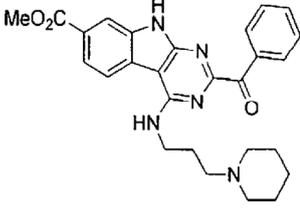
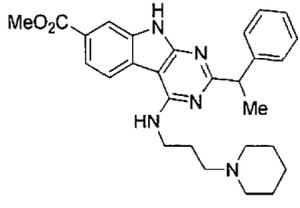
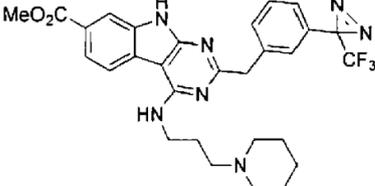
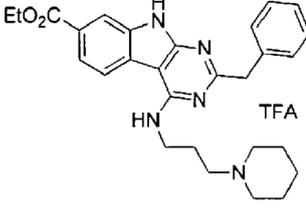
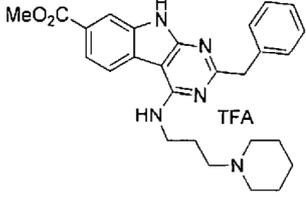
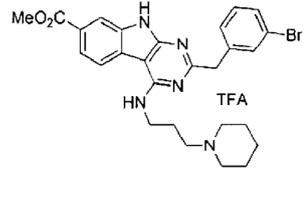
ES 2 733 946 T3

Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
				
10		1,34	326,2	B
11		1,40	354,2	C
12		1,29	370,2	A
13		1,45	394,2	D

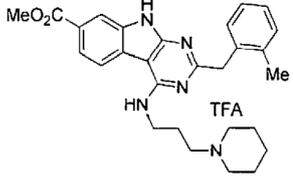
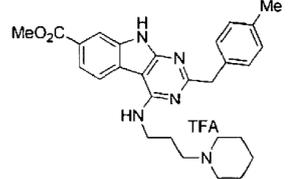
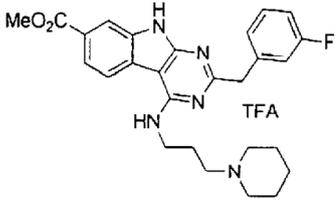
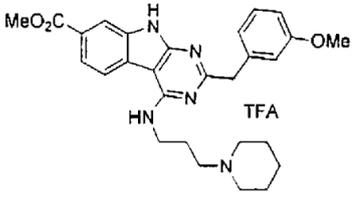
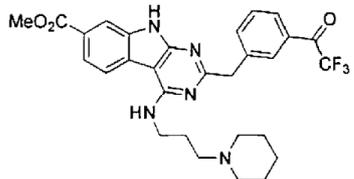
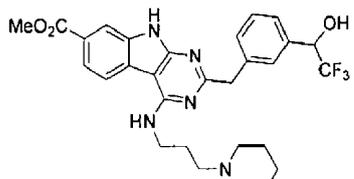
Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
				
14		1,44	392,2	D
15		1,43	459,2	E
16		1,78	459,2518	C
17		1,54	460,2	B

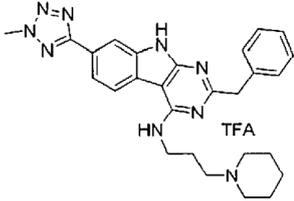
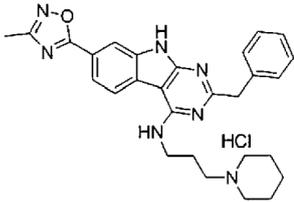
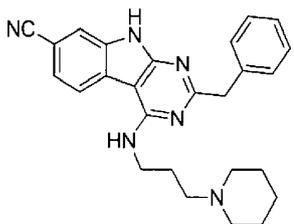
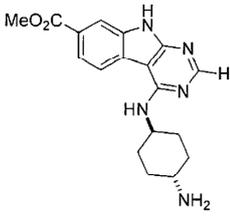
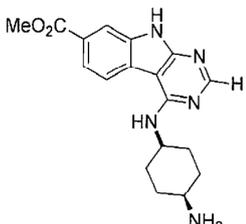
ES 2 733 946 T3

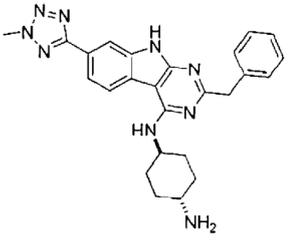
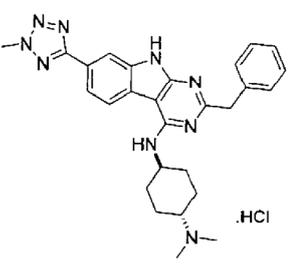
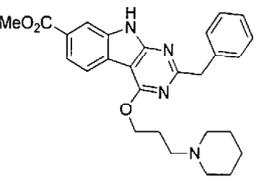
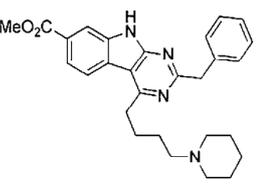
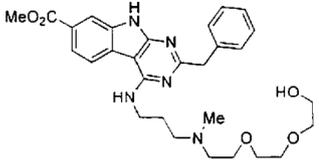
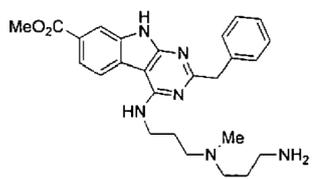
Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
18		2,068	464,2145	E
19		2,349	662,063	E
20		2,206	508,2707	D
21		1,78	488,2665	E
22		1,68	474,2511	F
23		2,129	472,2342	F

Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
				
24		2,083	472,2724	E
25		2,05	566,2497	E
26		2,152	472,2733	F
27		2,052	458,2598	E
28		2,194	538,1670	E

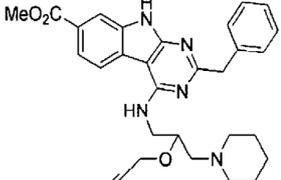
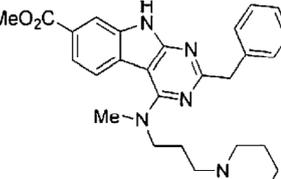
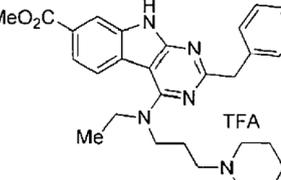
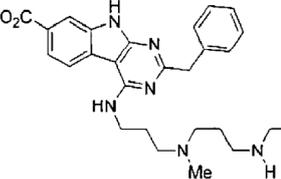
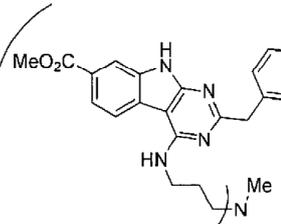
ES 2 733 946 T3

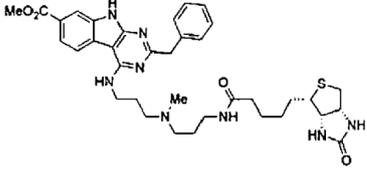
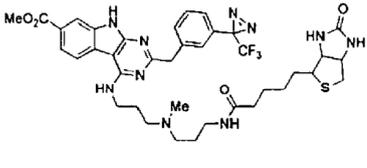
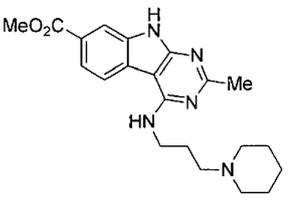
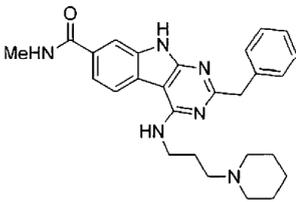
Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
29		2,142	472,2756	E
30		2,142	472,2740	E
31		2,112	476,2499	E
32		2,070	488,2690	E
33		1,761,87 (hidratos)	554,2384	E
34		2,142	554,2	E
35		2,063	482,28	E

Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
				
36		1,79	482,2663	F
37		1,68	425,2448	C
38		1,44	340,2	D
39		1,38	340,2	C
40		1,72	454,2	E

Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
				
41		1,71	482,2785	E
42		1,92	459,2392	B
43		1,75	457,2598	F
44		2,035	536,2867	E
45		1,63	461,2	E

ES 2 733 946 T3

Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀) [*]
46		1,70	474,2476	E
47		1,85	512,2632	E
48		1,74	472,2717	E
49		2,161	586,2839	A
50		1,65	499,2823	F
51		2,01	776,3	E

Número de compuesto	Estructura	R _T (min) en HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (EC ₅₀)*
52		1,70	687,3	C
53		2,06	795,3368	F
54		1,46	382,2	A
55		1,53	457,2708	A

La EC₅₀ se define como la concentración que da como resultado un aumento del 50% en el recuento de células CD34+CD45RA- en comparación con los cultivos de vehículo (DMSO). *EC₅₀: A >1000 nM; B = 500-1000 nM; C = 250-500 nM; D = 100-250; E = <100 nM; F = el compuesto mostró una expansión > 1,3 veces.

Ensayo funcional *ex vivo*:

- 5 La funcionalidad *ex vivo* de las células expandidas se probó usando las unidades convencionales de formación de colonias en ensayo de cultivo (CFU-C). Las células no tratadas o las células incubadas con DMSO, control positivo o un compuesto de la invención se sembraron en placas en medio de metilcelulosa en condiciones convencionales. Como ejemplo, el compuesto 1 (Tabla 1, Ejemplo 1) expande el número de progenitores hematopoyéticos multipotentes. El cultivo en metilcelulosa de 1000 células CD34+ de mPB tratadas con el compuesto 1 durante 10 días dio como resultado un aumento de 5 veces en el multilineaje de granulocitos eritrocitos, macrófagos y megacariocitos (colonias GEMM) sobre las células de entrada y un aumento de 10 veces en comparación con las células control. Esto sugiere que el compuesto 1 promueve la expansión de células progenitoras multipotentes.

Ensayo funcional *in vivo*:

- 15 Las células de mPB CD34+ cultivadas con compuestos de la invención injertan ratones inmunodeprimidos de la cepa NOD scid gamma (NSG). El resultado de 2.000.000 y 500.000 células de mPB CD34+ cultivadas durante 10 días con el compuesto 1 (Tabla 1, Ejemplo 1) o las condiciones de control de vehículo se trasplantaron en ratones NSG. Después de 8 semanas posteriores al trasplante, se verificó la reconstitución de células hematopoyéticas humanas en la médula ósea NSG usando anticuerpos contra el CD45 humano. Las células tratadas con el compuesto 1, pero no con el vehículo, pudieron injertar ratones NSG. Además, también se confirmó la reconstitución de los compartimentos mieloides y linfoides humanos, ya que las células de la médula ósea fueron positivas para CD33+ y CD19+ humanas respectivamente. Estos resultados muestran que las CD34+ de mPB expandidas con el

compuesto 1 no solamente contribuyen al injerto, sino que también conservan el potencial de repoblación multilinjaje *in vivo*.

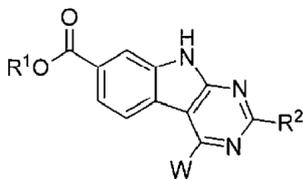
Combinación de compuestos:

5 Las células de mPB CD34+ cultivadas con compuestos de la invención injertan ratones inmunodeprimidos de la cepa NOD scid gamma (NSG). El resultado de 2.000.000 y 500.000 células de mPB CD34+ cultivadas durante 10 días con el compuesto 1 (Tabla 1, Ejemplo 1) o las condiciones de control del vehículo se trasplantaron en ratones NSG. Después de 8 semanas posteriores al trasplante, se comprobó la reconstitución de células hematopoyéticas humanas en la médula ósea NSG utilizando un anticuerpo contra el CD45 humano. Las células tratadas con el compuesto 1, pero no con el vehículo, pudieron injertar ratones NSG. Además, también se confirmó la reconstitución de los compartimentos mieloides y linfoides humanos, ya que las células de la médula ósea fueron positivas para CD33+ y CD19+ humanas respectivamente. Estos resultados muestran que las CD34+ de mPB expandidas con el compuesto 1 no solamente contribuyen al injerto, sino que también conservan el potencial de repoblación multilinjaje *in vivo*.

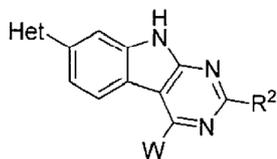
15 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios, a la luz de los mismos, a los expertos en la técnica y se incluirán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

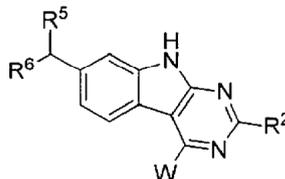
1. Un compuesto que es de la fórmula IIA, fórmula IIB o fórmula IIC



IIA



IIB



IIC

o una sal del mismo,

Het es un heterociclo de 3 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con uno o más R¹ o R^A;

R⁵ y R⁶ son iguales o diferentes y son cada uno independientemente L, o se unen conjuntamente con C para formar un anillo de 5 miembros que opcionalmente incluye uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S, opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más R¹ o R^A;

W es 74) -(N(R₁)-L)_n-N(R₁)R₁,

O W es

- 1) -H,
- 2) -halógeno,
- 3) -OR¹,
- 4) -L-OH,
- 5) -L-OR¹,
- 6) -SR¹,
- 7) -CN,
- 8) -P(O)(OR¹)(OR¹),
- 9) -NHR¹,
- 10) -N(R¹)R¹,
- 11) -L-NH₂,
- 12) -L-NHR¹,
- 13) -L-N(R¹)R¹,
- 14) -L-SR¹,
- 15) -L-S(O)R¹,
- 16) -L-S(O)₂R¹,
- 17) -L-P(O)(OR¹)(OR¹),
- 18) -C(O)OR¹,
- 19) -C(O)NH₂,
- 20) -C(O)NHR¹,
- 21) -C(O)N(R¹)R¹,

- 22) -NHC(O)R¹,
 23) -NR¹C(O)R¹,
 24) -NHC(O)OR¹,
 25) -NR¹C(O)OR¹,
 5 26) -OC(O)NH₂,
 27) -OC(O)NHR¹,
 28) -OC(O)N(R¹)R¹,
 29) -OC(O)R¹,
 30) -C(O)R¹,
 10 31) -NHC(O)NH₂,
 32) -NHC(O)NHR¹,
 33) -NHC(O)N(R¹)R¹,
 34) -NR¹C(O)NH₂,
 35) -NR¹C(O)NHR¹,
 15 36) -NR¹C(O)N(R¹)R¹,
 37) -NHS(O)₂R¹,
 38) -NR¹S(O)₂R¹,
 39) -S(O)₂NH₂,
 40) -S(O)₂NHR¹,
 20 41) -S(O)₂N(R¹)R¹,
 42) -S(O)R¹,
 43) -S(O)₂R¹,
 44) -OS(O)₂R¹,
 45) -S(O)₂OR¹,
 25 46) -bencilo opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes R^A o R¹,
 47) -L-heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heteroarilo,
 48) -L-heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo,
 30 49) -L-arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo,
 50) -L-NR¹(R¹),
 51) -L-) ₂NR¹,
 52) -L-(N(R¹)-L)_n-N(R¹)R¹,
 35 53) -L-(N(R¹)-L)_n - heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heteroarilo,
 54) -L-(N(R¹)-L)_n - heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo,

- 55) -L-(N(R¹)-L)_n - arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo,
- 56) -O-L-N(R¹)R¹,
- 57) -O-L- heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heteroarilo,
- 58) -O-L- heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo,
- 59) -O-L- arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo,
- 60) -O-L)₂-NR¹,
- 61) -O-L-(N(R¹)-L)_n - N(R¹)R¹,
- 62) -O-L-(N(R¹)-L)_n - heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heteroarilo,
- 63) -O-L-(N(R¹)-L)_n - heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo,
- 64) -O-L-(N(R¹)-L)_n- arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹,
- 65) -S-L- heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹,
- 66) -S-L- heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹,
- 67) -S-L- arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo,
- 68) -S-L)₂NR¹,
- 69) -S-L-(N(R¹)-L)_n - N(R¹)R¹,
- 70) -S-L-(N(R¹)-L)_n - heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A,
- 71) -S-L-(N(R¹)-L)_n - heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A,
- 72) -S-L-(N(R¹)-L)_n - arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A,
- 73) -NR¹(R¹),
- 75) -N(R¹)L)₂-NR¹,
- 76) -(N(R¹)-L)_n - N(R¹)R^A,
- 77) -(N(R¹)-L)_n - heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹,
- 78) -(N(R¹)-L)_n - heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹,
- 79) -(N(R¹)-L)_n - arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹,
- 80) -heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A, o
- 81) -arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A,
- y en donde cada sustituyentes está opcionalmente unido al grupo L si aún no está presente,
- y en donde cuando dos sustituyentes R¹ están presentes en el mismo átomo de nitrógeno, entonces cada sustituyente R¹ se selecciona independientemente a partir de la lista de valores R¹ que se describe a continuación,
- y en donde n es un número entero igual a 0, 1, 2, 3, 4, ó 5,
- y en donde, cuando (R¹) y R¹ están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente se unen conjuntamente con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que opcionalmente incluye uno u otros más heteroátomos seleccionados de N, O y S, opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más R¹ o R^A;

L es 4) -cicloalquilo(C₃-C₇) o 1) -alquilo(C₁-C₆),

o L es

2) -alqueno(C₂-C₆),

3) -alquino(C₂-C₆),

5 5) -cicloalqueno(C₃-C₇),

6) heterociclilo,

7) -alquil(C₁-C₆)-cicloalquilo(C₃-C₇),

8) -alquil(C₁-C₆),-heterociclilo,

9) arilo, o

10 10) heteroarilo,

y en donde los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, heterociclilo, arilo y heteroarilo están cada uno independientemente sustituidos opcionalmente con uno o dos sustituyentes R^A;

R¹ es

1) -H,

15 2) -alquilo(C₁-C₆),

3) -alqueno(C₂-C₆),

4) -alquino(C₂-C₆),

5) -cicloalquilo(C₃-C₇),

6) -cicloalqueno(C₃-C₇),

20 7) -(C₁-C₆) perfluorado,

8) -heterociclilo,

9) -arilo,

10) -heteroarilo,

11) -bencilo, o

25 12) 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]pentanoílo, y en donde los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están cada uno independientemente sustituidos opcionalmente con 1, 2 ó 3 sustituyentes R^A o R¹;

R² es 7) bencilo opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes R^A o R¹; o 1) -H,

O R² es

30 2) -alquilo(C₁-C₆),

3) -SR¹,

4) -C(O)R¹,

5) -S(O)R¹,

6) -S(O)₂R¹,

35 8) -L-heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heteroarilo,

9) -L-heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R¹ unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y heterociclilo,

10) -L-arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R^1 unidos a cualquiera de los dos, o ambos, grupos L y arilo,

11) -heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R^1 , o

12) -arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R^A o R^1 ,

5 y en donde cada sustituyente está unido opcionalmente al grupo L si aún no está presente;

R^A es

1) -halógeno,

2) - CF_3 ,

3) -OH,

10 4) - OR^1 ,

5) -L-OH,

6) -L- OR^1 ,

7) - OCF_3 ,

8) -SH,

15 9) - SR^1 ,

10) -CN,

11) - NO_2 ,

12) - NH_2 ,

13) - NHR^1 ,

20 14) - NR^1R^1 ,

15) -L- NH_2 ,

16) -L- NHR^1 ,

17) -L- NR^4R^1 ,

18) -L- SR^1 ,

25 19) -L-S(O) R^1 ,

20) -L-S(O) $_2R^1$,

21) -C(O)OH,

22) -C(O)OR 1 ,

23) -C(O)NH $_2$,

30 24) -C(O)NHR 1 ,

25) -C(O)N(R 1)R 1 ,

26) -NHC(O)R 1 ,

27) -NR 1 C(O)R 1 ,

28) -NHC(O)OR 1 ,

35 29) -NR 1 C(O)OR 1 ,

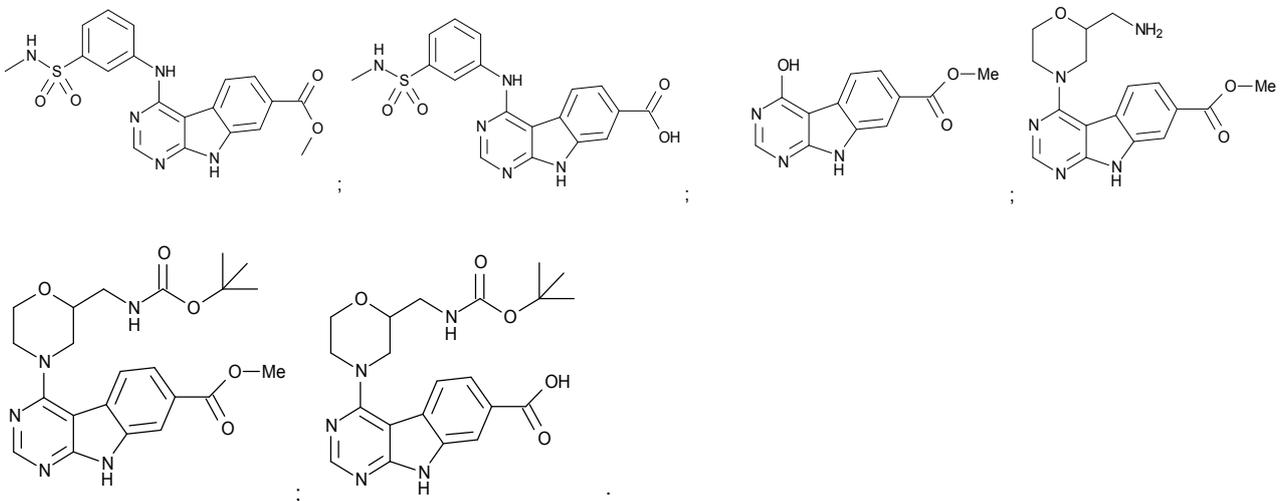
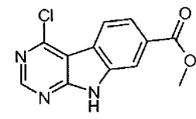
30) -OC(O)NH $_2$,

31) -OC(O)NHR 1 ,

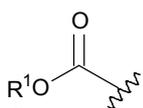
- 32) -OC(O)N(R¹)R¹,
 33) -OC(O)R¹,
 34) -C(O)R¹,
 35) -NHC(O)NH₂,
 5 36) -NHC(O)NHR¹,
 37) -NHC(O)N(R¹)R¹,
 38) -NR¹C(O)NH₂,
 39) -NR¹C(O)NHR¹,
 40) -NR¹C(O)N(R¹)R¹,
 10 41) -NHS(O)₂R¹,
 42) -NR¹S(O)₂R¹,
 43) -S(O)₂NH₂,
 44) -S(O)₂NHR¹,
 45) -S(O)₂N(R¹)R¹,
 15 46) -S(O)R¹,
 47) -S(O)₂R¹,
 48) -OS(O)₂R¹,
 49) -S(O)₂OR¹,
 50) -bencilo,
 20 51) -N₃, o
 52) -C(-N=N-)(CF₃),

y en donde el grupo bencilo está sustituido opcionalmente con 1, 2 ó 3 sustituyentes R^A o R¹, siempre que el

25 compuesto de Fórmula IIA, Fórmula IIB o Fórmula IIC sea distinto de



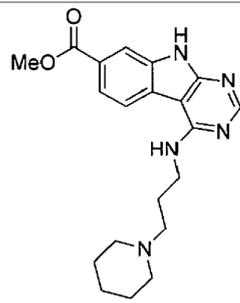
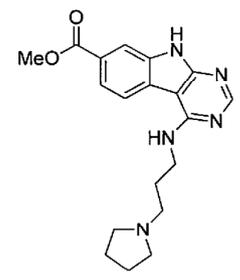
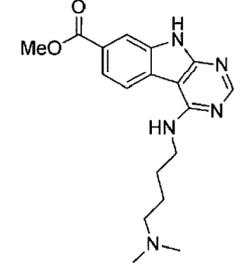
2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde el heteroátomo es N en el anillo de 5 miembros formado por R⁵ y R⁶ conjuntamente.
3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho compuesto tiene la fórmula IIC y R² es bencilo.
4. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde:

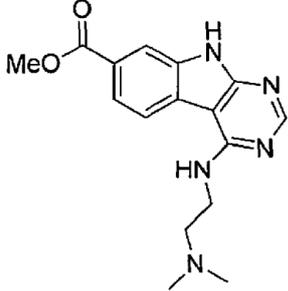
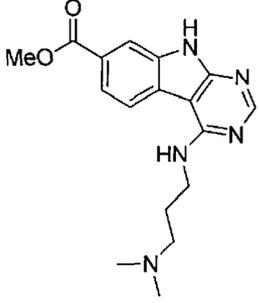
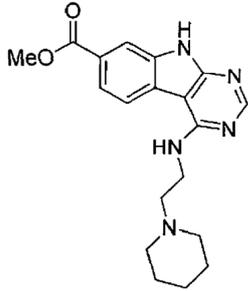
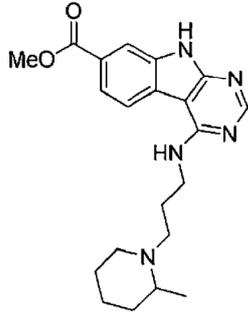
en la fórmula IIA,  es CO₂Me y en la fórmula IIC, R⁵ y R⁶ se unen conjuntamente con C para formar 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo;

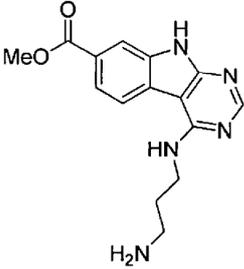
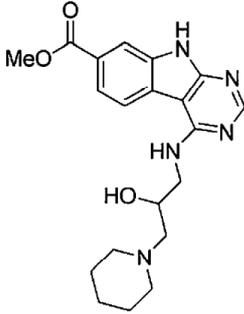
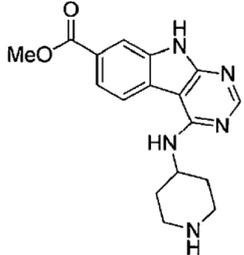
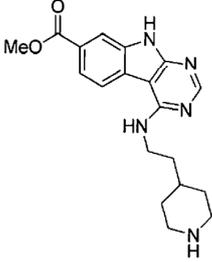
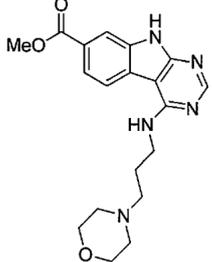
R² es bencilo, 3-tienilmetilo o 3-piridinil metilo; y

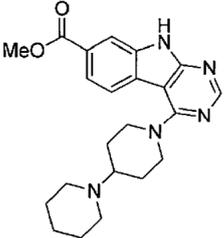
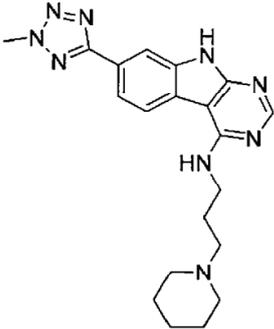
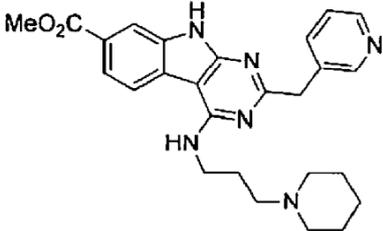
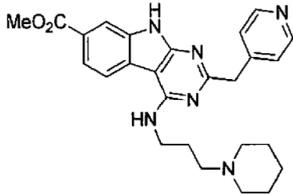
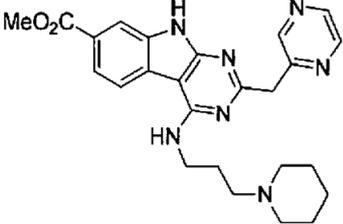
W es NH-L-N(R¹)R¹ en donde L es alquilo(C₂-C₄) y R¹ es alquilo(C₁-C₄) o (R¹) y R¹ se unen conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están enlazados para formar un anillo de 3 a 7 miembros, que opcionalmente incluye uno u otros más heteroátomos seleccionados de N, O y S, opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más R¹ o R^A.

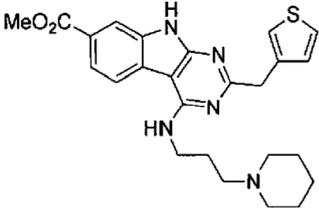
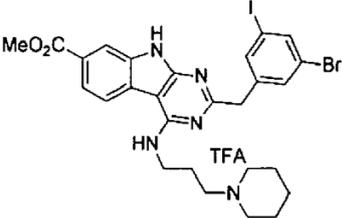
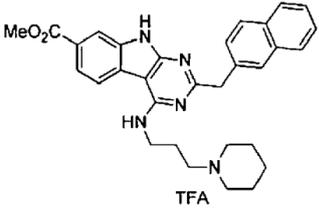
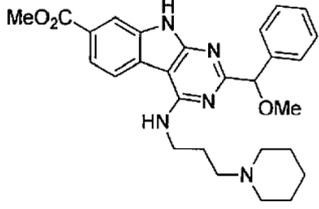
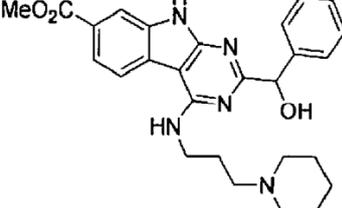
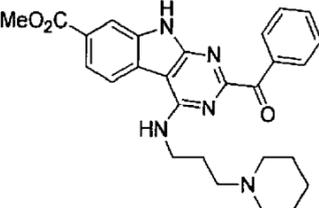
5. Un compuesto que es:

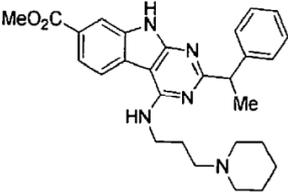
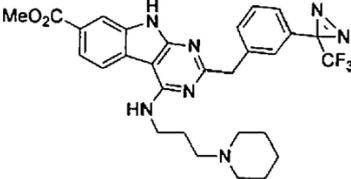
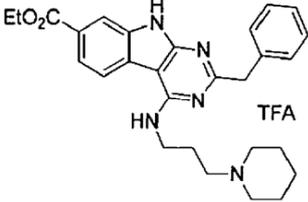
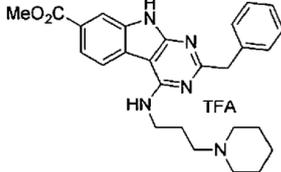
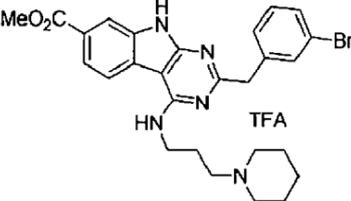
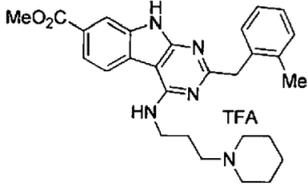
Número de compuesto	Estructura
1	
2	
3	

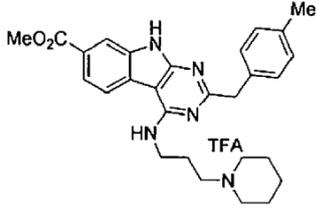
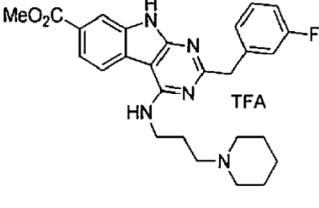
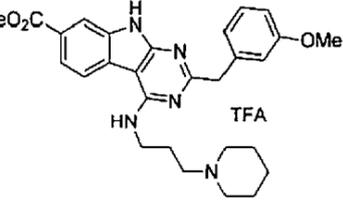
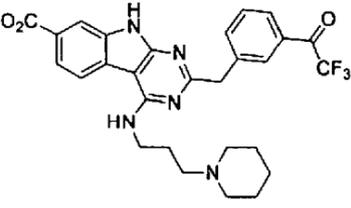
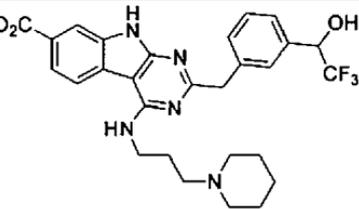
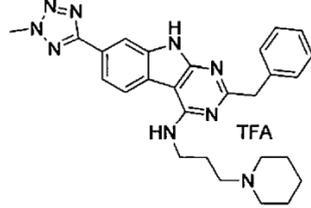
Número de compuesto	Estructura
4	 <chem>CN(C)CCNC1=NC2=C(N1)C=CC=C2C(=O)OC</chem>
5	 <chem>CN(C)CCNC1=NC2=C(N1)C=CC=C2C(=O)OC</chem>
6	 <chem>C1CCNCC1NC1=NC2=C(N1)C=CC=C2C(=O)OC</chem>
7	 <chem>CN1CCCC1NC1=NC2=C(N1)C=CC=C2C(=O)OC</chem>

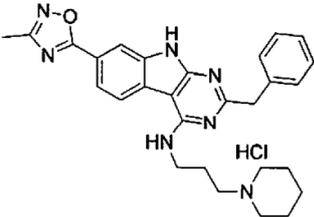
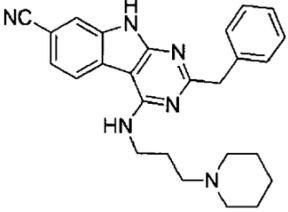
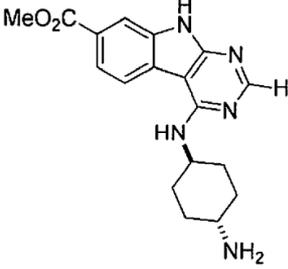
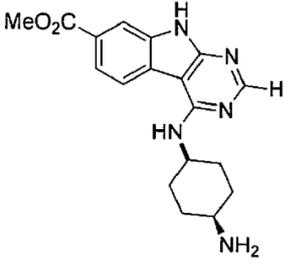
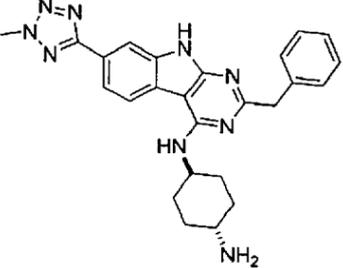
Número de compuesto	Estructura
8	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3CCCN</chem>
9	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3CC(O)CN4CCCC4</chem>
10	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3N4CCNCC4</chem>
11	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3NCCCN4CCCC4</chem>
12	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3NCCCN4CCOC4</chem>

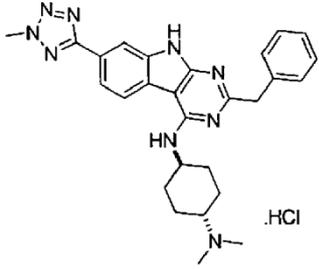
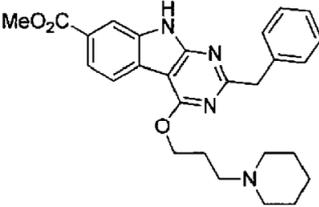
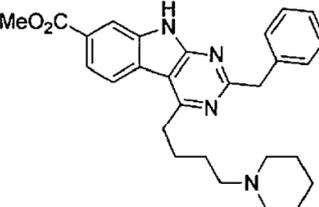
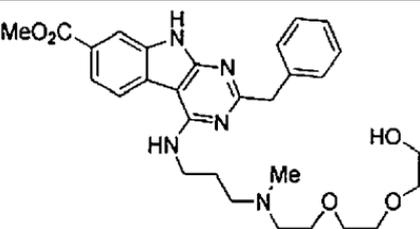
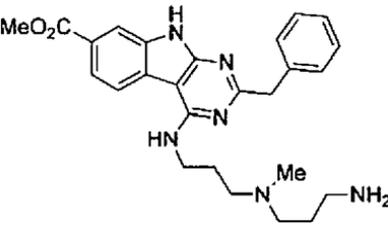
Número de compuesto	Estructura
13	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3C4CCN(C4)C5CCN5</chem>
14	 <chem>C1=CN=CN=C1Cc2c3c[nH]c23NCCC4CCN4</chem>
15	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3C4=CN=CC=C4NCCC5CCN5</chem>
16	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3C4=CN=CC=C4NCCC5CCN5</chem>
17	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3C4=CN=CN=C4NCCC5CCN5</chem>

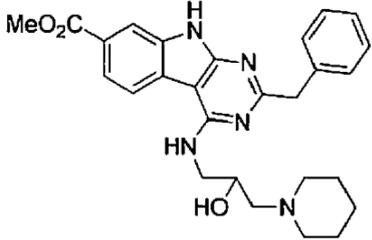
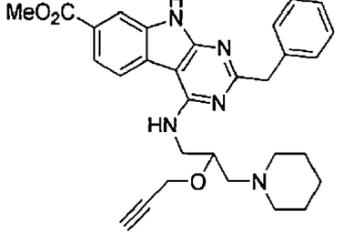
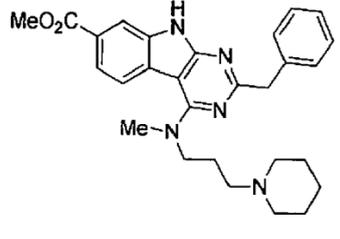
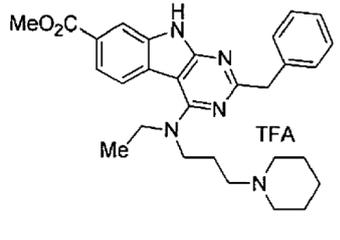
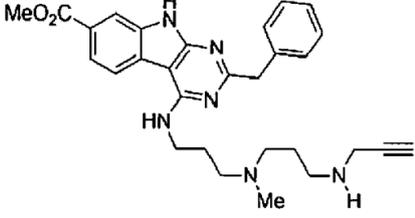
Número de compuesto	Estructura
18	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(nc2)CSC3NCCC4CCCCN4</chem>
19	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(nc2)CSC3NCCC4CCCCN4BrI</chem> <p>TFA</p>
20	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(nc2)CSC3NCCC4CCCCN4c1ccc2ccccc12</chem> <p>TFA</p>
21	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(nc2)CSC3NCCC4CCCCN4COc1ccccc1</chem>
22	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(nc2)CSC3NCCC4CCCCN4COc1ccccc1</chem>
23	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(nc2)CSC3NCCC4CCCCN4C(=O)c1ccccc1</chem>

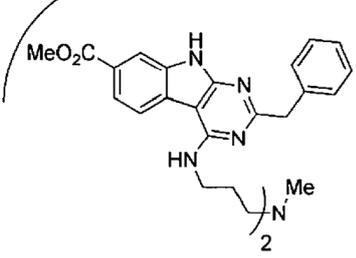
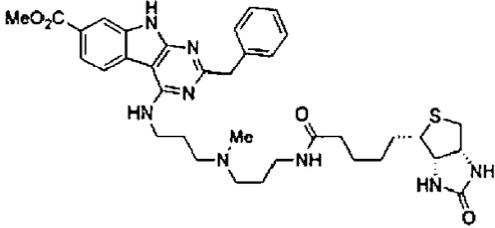
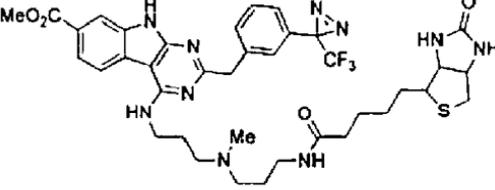
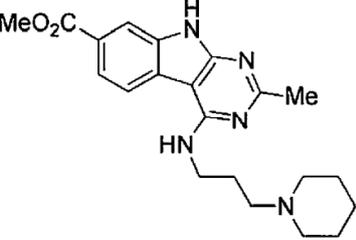
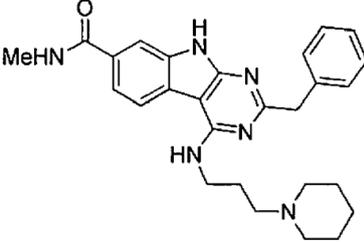
Número de compuesto	Estructura
24	
25	
26	
27	
28	
29	

Número de compuesto	Estructura
30	
31	
32	
33	
34	
35	

Número de compuesto	Estructura
36	 <chem>Cc1ncnc1-c2ccc3c(c2)c4c(c3)nc(Cc5ccccc5)n4NCCCN6CCCCN6.Cl</chem>
37	 <chem>N#Cc1ccc2c(c1)c3c(c2)c4c(c3)nc(Cc5ccccc5)n4NCCCN6CCCCN6</chem>
38	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)c4c(c3)nc(N)n4N[C@@H]5CCCCN5</chem>
39	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)c4c(c3)nc(N)n4N[C@@H]5CCCCN5</chem>
40	 <chem>C1=NN=C(N1)-c2ccc3c(c2)c4c(c3)nc(Cc5ccccc5)n4N[C@@H]6CCCCN6</chem>

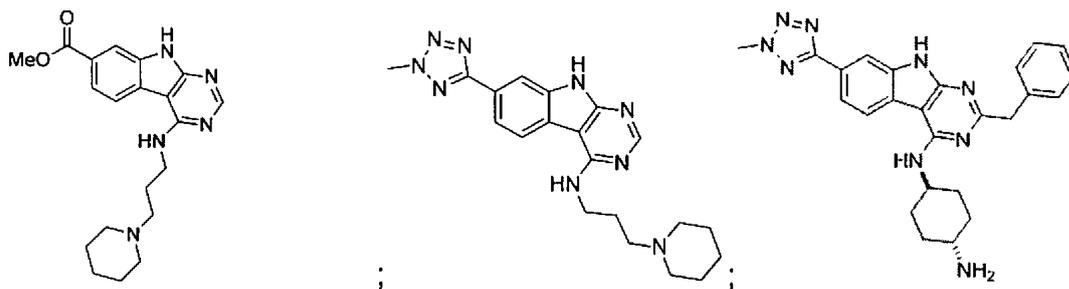
Número de compuesto	Estructura
41	
42	
43	
44	
45	

Número de compuesto	Estructura
46	
47	
48	
49	
50	

Número de compuesto	Estructura
51	
52	
53	
54	
55	

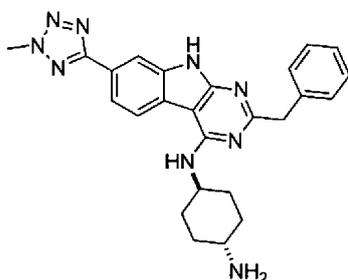
o una sal de mismo.

6. Un compuesto según la reivindicación 1 que es



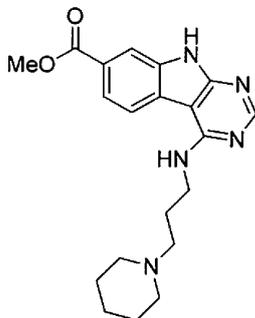
o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

7. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto es



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

8. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto es



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

9. Un método para aumentar células madre y progenitoras, comprendiendo el método: cultivar *in vitro* o *ex vivo* una población celular de partida que comprende células madre hematopoyéticas con un agente que comprende un compuesto o una sal del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, opcionalmente junto con al menos un factor de expansión celular que es una molécula biológica u otra molécula pequeña.

10. Un método de la reivindicación 9, en el que la población celular de partida incluye células CD34+ recogidas de sangre periférica movilizada (mPB), médula ósea (BM) o sangre del cordón umbilical (UCB).

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal del mismo para usar en el tratamiento de un trastorno/neoplasia maligna hematopoyética, una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inmunodeficiente hereditaria en un sujeto.

5 13. El compuesto como se define en la reivindicación 12, en donde dicho trastorno/neoplasia maligna hematopoyética, enfermedad autoinmune y/o enfermedad inmunodeficiente hereditaria comprende afecciones de insuficiencia de la médula ósea, una variedad de enfermedades congénitas de interés mundial (por ejemplo, anemia de células falciformes y talasemia), lupus, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, trastornos mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, anemia aplásica, aplasia pura de células rojas, hemoglobinuria,

anemia de Fanconi, talasemia, anemia de células falciformes, síndrome de Wiskott-Aldrich, errores congénitos del metabolismo (como la enfermedad de Gaucher).

14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11, que es adecuada para infusión intravenosa.

5 15. Un estuche para su uso en expandir células madre hematopoyéticas, que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal del mismo, e instrucciones de uso; opcionalmente el estuche comprende al menos un factor de expansión celular que es una molécula biológica u otra molécula pequeña.

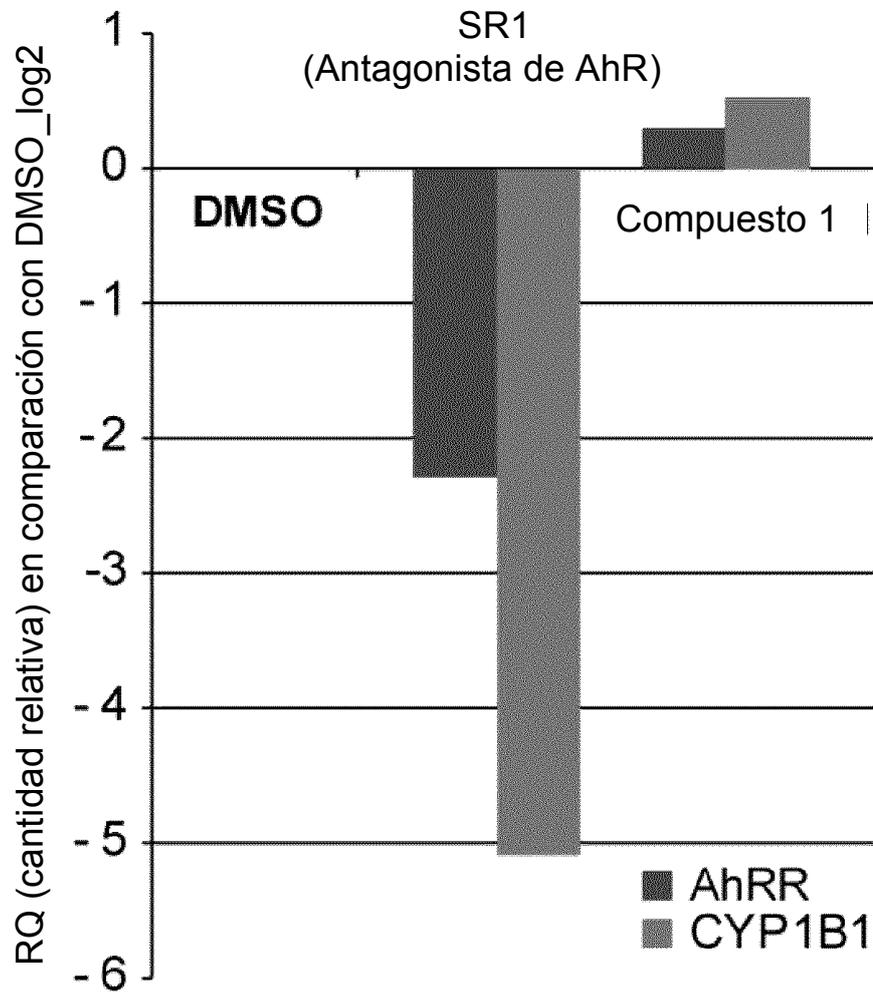


FIGURA 1

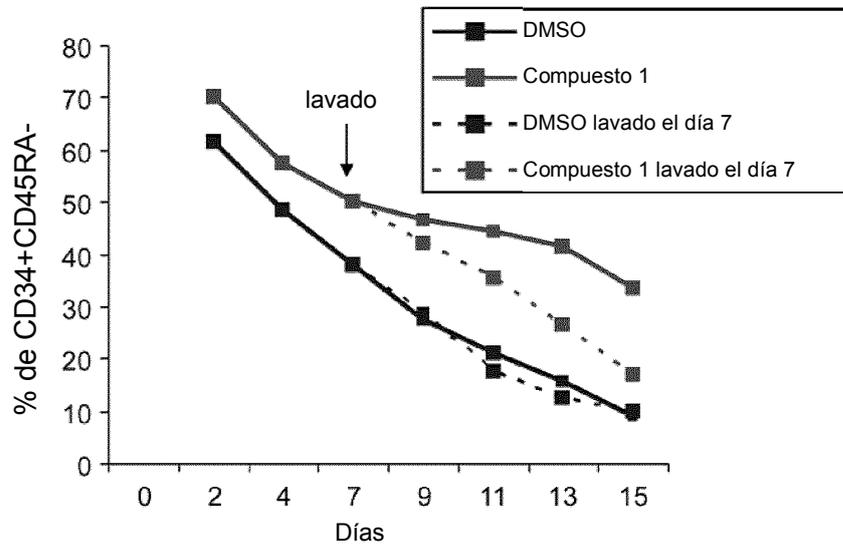


FIGURA 2

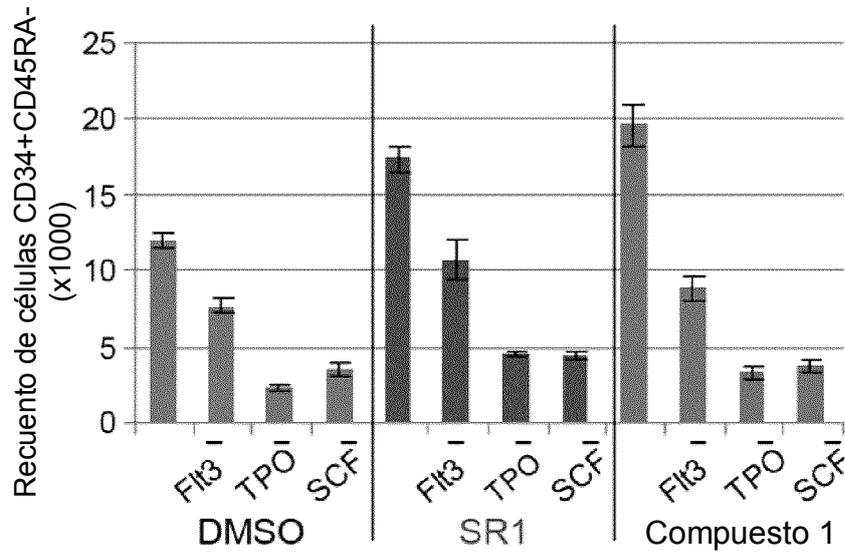


FIGURA 3

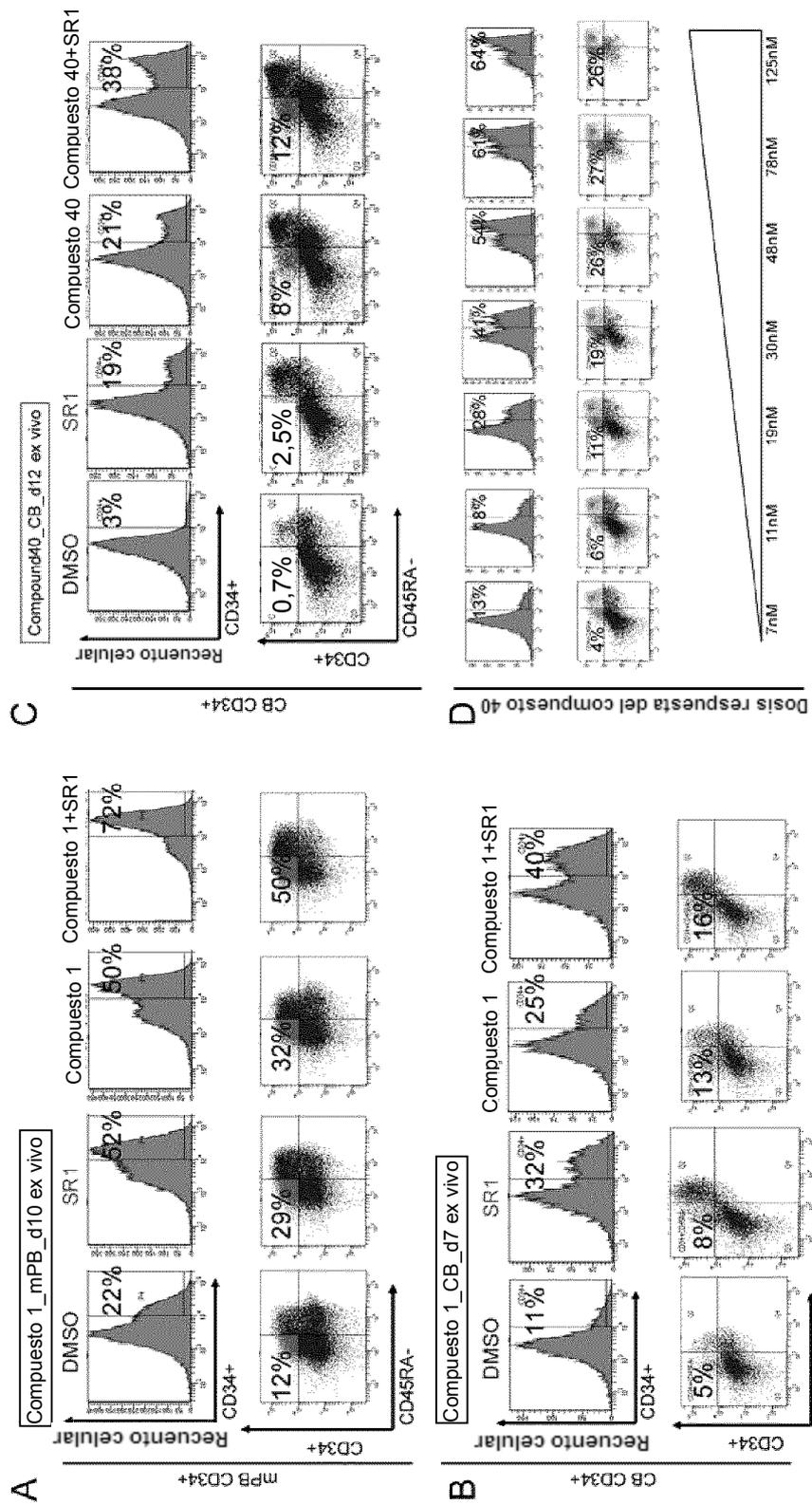


FIGURA 4

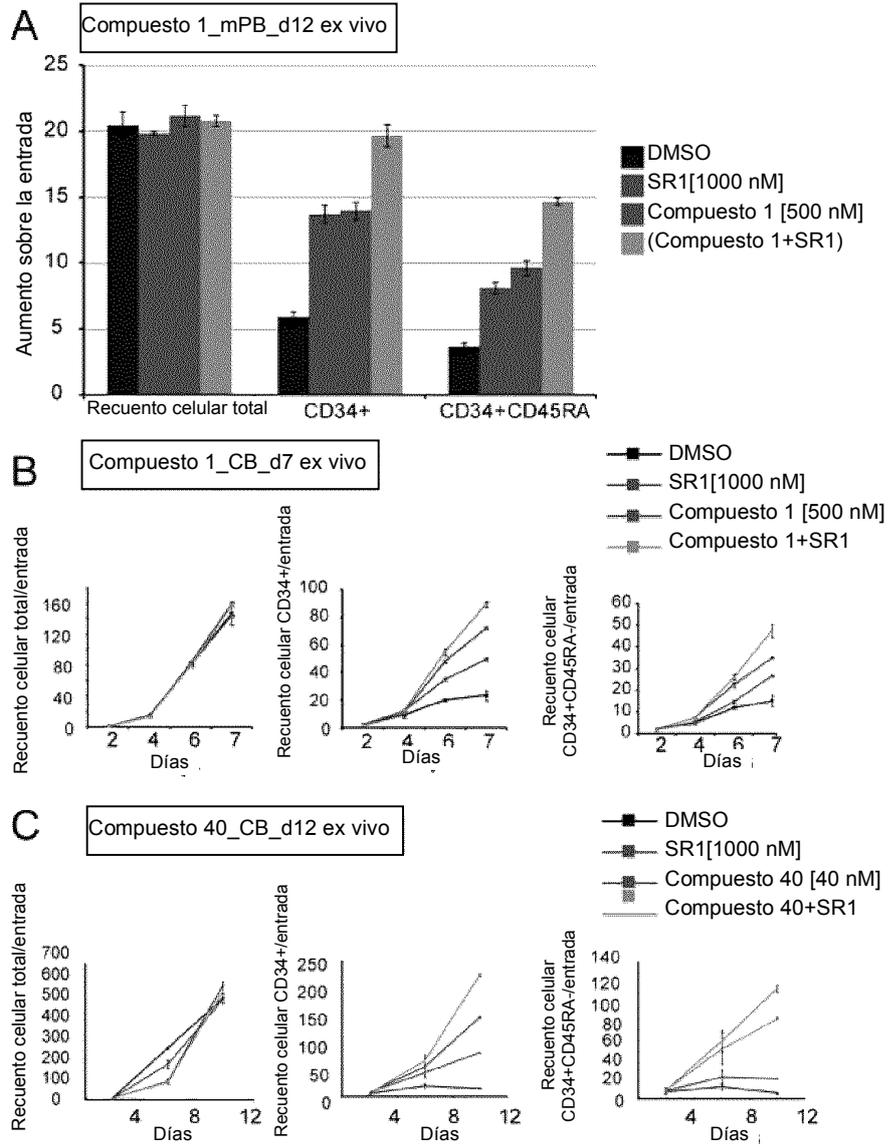


FIGURA 5

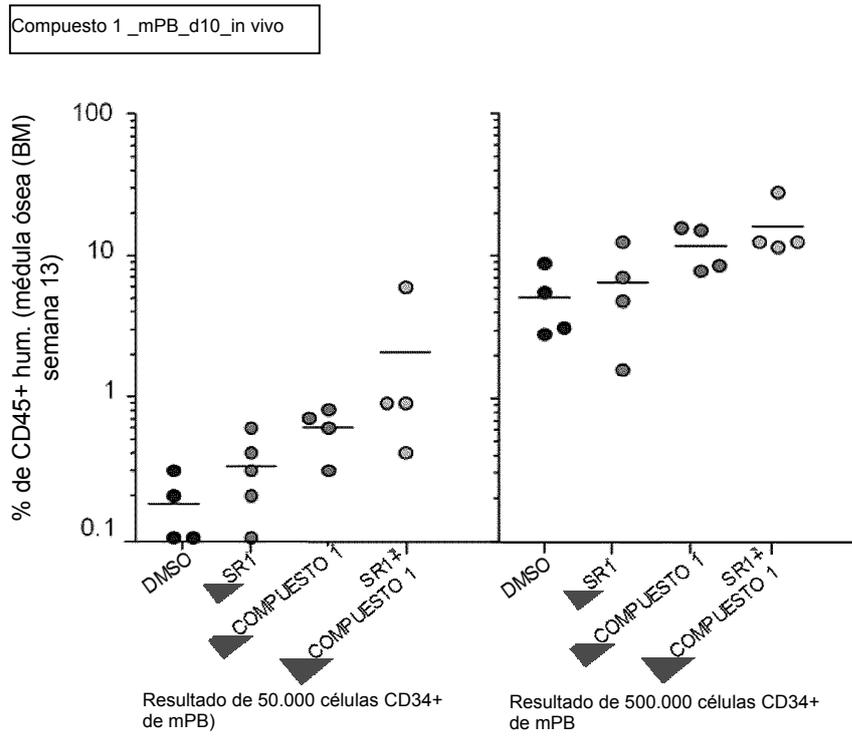


FIGURA 6

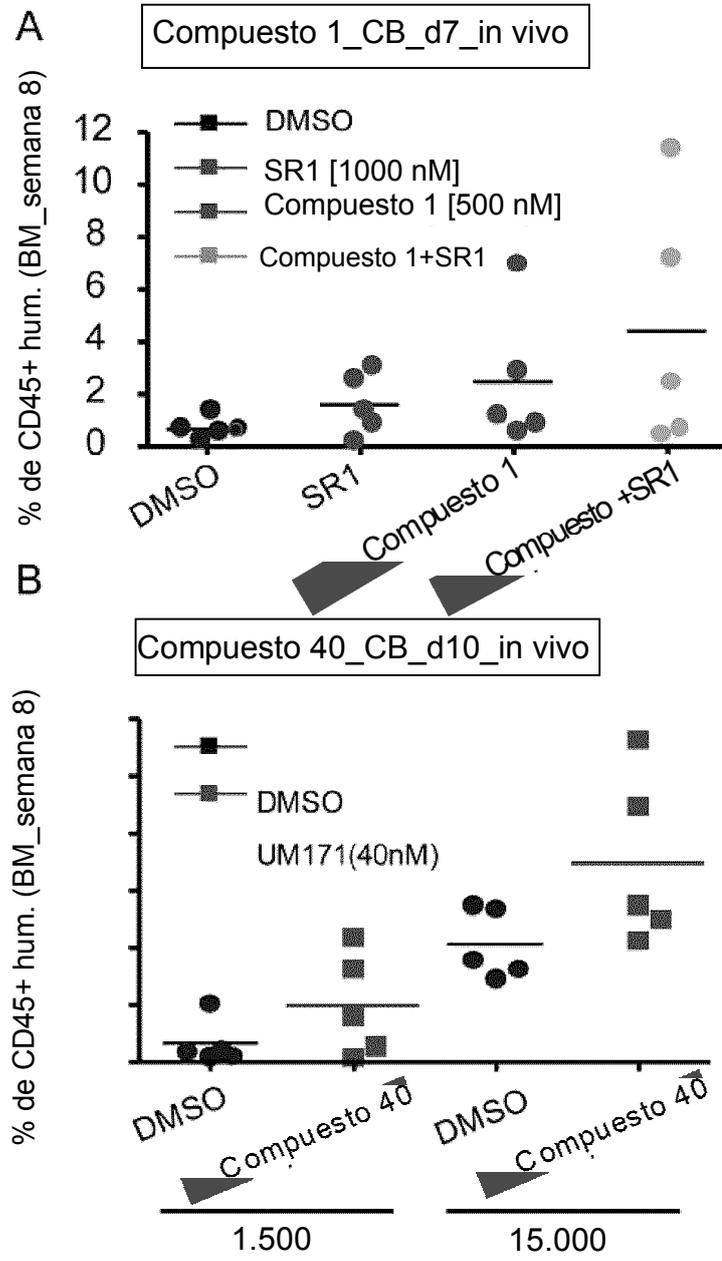


FIGURA 7

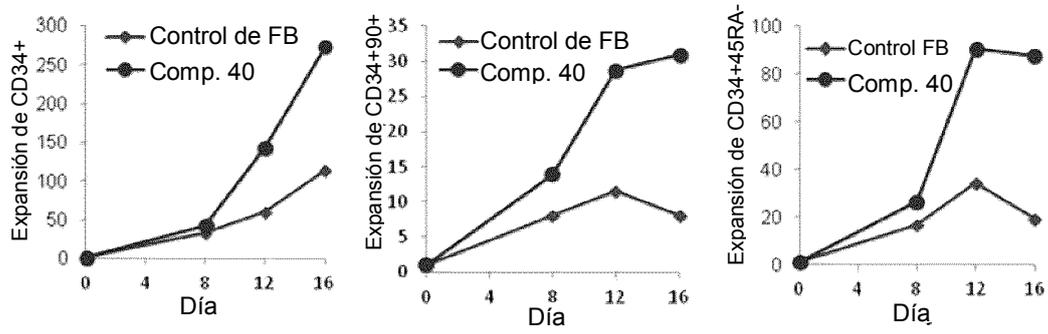


FIGURA 8