

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 892**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87	(2006.01)
A61K 35/12	(2015.01)
A61K 35/28	(2015.01)
A61K 48/00	(2006.01)
C07K 5/10	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01)
C12N 15/867	(2006.01)
C12N 5/0789	(2010.01)
C07D 487/04	(2006.01)
C07K 5/083	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2015 PCT/CA2015/050907**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16041080**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2015 E 15841193 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3194602**

54 Título: **Compuestos y métodos para incrementar la transferencia génica viral en células hematopoyéticas humanas**

30 Prioridad:

18.09.2014 US 201462052452 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL (33.3%)
2900 Boulevard Edouard-Montpetit
Montreal, QC H3T 1J4, CA;
BRITISH COLUMBIA CANCER AGENCY BRANCH
(33.3%) y
FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SAUVAGEAU, GUY;
HUMPHRIES, KEITH RICHARD;
KIEM, HANS-PETER;
FARES, IMAN y
CHAGRAOUI, JALILA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 773 892 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

Compuestos y métodos para incrementar la transferencia génica viral en células hematopoyéticas humanas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos de nº de serie 62/052.452, presentada el 18 de septiembre de 2014.

Campo técnico

La presente invención se refiere en general a la transferencia génica viral, y de manera más específica a la transferencia génica viral en células tales como células madre hematopoyéticas (HSCs), y las aplicaciones de la misma.

10 Técnica antecedente

15 La transferencia génica en células madre hematopoyéticas (HSCs) sigue siendo una aproximación atractiva para el tratamiento de numerosos trastornos genéticos. El progreso reciente en el campo de la terapia génica ha suscitado además la esperanza de que los pacientes afectados por hemoglobinopatías, tales como β -talasemia y anemia de células falciformes, se beneficien de las nuevas aproximaciones terapéuticas. El trasplante de células hematopoyéticas (HCs) modificadas con vectores lentivirales que portan el gen de β -globina ha dado como resultado la corrección a largo plazo de varios modelos en ratón de hemoglobinopatías (Imren et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99: 14380-14385; Malik et al., Ann NY Acad Sci. 2005;1054:238-249; May et al, Nature., 2000;406:82-86; Pawliuk et al, Science., 2001;294: 2368-2371), pero solamente ha conducido a la independencia de transfusiones en un paciente de β -talasemia (Cavazzana-Calvo et al, Nature., 2010;467:318-322).

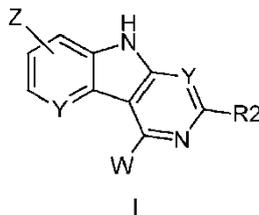
20 La seguridad y utilidad de tales tratamientos, sin embargo, están limitadas por las dificultades para conseguir un número suficiente de HSCs transducidas, debido al escaso rendimiento o funcionalidad de las células transducidas. Se ha informado del uso de diferentes agentes para incrementar la transferencia génica retroviral, por ejemplo fibronectina (documento US 5686278, Chono H et al. J Biochem., mar. de 2011;149(3):285-92; Lee HJ, Lee YS, et al. Biologicals., ago. de 2009;37(4):203-9), Tat de HIV (Nappi F, et al. J Gene Med., nov. de 2009;11(11):955-65), Vectofusina-1 (Fenard D, et al., Mol Ther Nucleic Acids., 7 de mayo de 2013;2:e90), desoxinucleósidos (Ravot E, et al., J Gene Med., mar.-abr. de 2002;4(2):161-9), y citocinas (Géronimi F et al., Stem Cells., 2003;21(4):472-80; Kiem HP, et al., Blood, 15 de sep. de 1998;92(6):1878-86).

Por tanto, existe la necesidad de nuevos compuestos y métodos para incrementar la transferencia génica en HSCs, especialmente en los métodos de terapia génica para el tratamiento o la prevención de trastornos hematopoyéticos.

30 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a los siguientes puntos [1] a [37]:

[1]. Un método para transducir un vector viral en células, y dicho método comprende poner en contacto dichas células *in vitro* con un compuesto de fórmula general I; y transducir dichas células con un vector viral,



35 o una sal o un profármaco del mismo,
en la que:

cada Y se selecciona independientemente de N y CH;

Z es

- 40 1) -CN
2) -C(O)OR1,
3) -C(O)N(R1)R3,
4) -C(O)R1, o

- 5) -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

en la que, cuando (R1) y R3 están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

5 W es

- 1) -CN,
- 2) -N(R1)R3,
- 3) -C(O)OR1,
- 4) -C(O)N(R1)R3,
- 10 5) -NR1C(O)R1,
- 6) -NR1C(O)OR1,
- 7) -OC(O)N(R1)R3,
- 8) -OC(O)R1,
- 9) -C(O)R1,
- 15 10) -NR1C(O)N(R1)R3,
- 11) -NR1S(O)₂R1,
- 12) -bencilo sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R1,
- 13) -X-L-(X-L)_n - N(R1)R3,
- 20 14) -X-L-(X-L)_n - heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 unidos en uno o los dos grupos L y heteroarilo,
- 15) -X-L-(X-L)_n - heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 unidos en uno o los dos grupos L y heterociclilo,
- 16) -X-L-(X-L)_n- arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,
- 17) -X-L-(X-L)_n-NR1RA o
- 25 18) -(N(R1)-L)_n - N⁺R1R3R5 R6⁻

en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, 3, 4, o 5,

y en la que, cuando R1 y R3 están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

30 cada X se selecciona independientemente de O, S, y NR1;

cada L es independientemente

- 1) -alquileno C₁₋₆,
- 2) -alquenileno C₂₋₆,
- 3) -alquinileno C₂₋₆,
- 35 4) -cicloalquileno C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S o
- 5) -cicloalquenileno C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S

en la que los grupos alquileno, alquenileno, alquinileno, cicloalquileno y cicloalquenileno están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con uno o dos sustituyentes R4 o RA;

R1 es cada uno independientemente

- 40 1) -H,

- 2) -alquilo C₁₋₆,
 3) -alqueno C₂₋₆,
 4) -alquino C₂₋₆,
 5) -cicloalquilo C₃₋₇,
 5 6) -cicloalqueno C₃₋₇,
 7) -C₁₋₅ perfluorado,
 8) -heterociclilo,
 9) -arilo,
 10) -heteroarilo, o
 10 11) -bencilo,

en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R2 es

- 1) -H,
 15 2) -alquilo C₁₋₆, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA
 3) -C(O)R₄,
 4) -L-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄,
 5) -L-heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R₄, o
 6) -L-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄;

20 R3 es cada uno independientemente

- 1) -H,
 2) -alquilo C₁₋₆,
 3) -alqueno C₂₋₆,
 4) -alquino C₂₋₆,
 25 5) -cicloalquilo C₃₋₇,
 6) -cicloalqueno C₃₋₇,
 7) -C₁₋₅ perfluorado,
 8) -heterociclilo,
 9) -arilo,
 30 10) -heteroarilo, o
 11) -bencilo,

en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

35 R4 es cada uno independientemente

- 1) -H,
 2) -alquilo C₁₋₆,
 3) -alqueno C₂₋₆,

- 5
- 4) -alquino C₂₋₆,
 - 5) -cicloalquilo C₃₋₇,
 - 6) -cicloalqueno C₃₋₇,
 - 7) -C₁₋₅ perfluorado,
 - 8) -heterociclilo,
 - 9) -arilo,
 - 10) -heteroarilo, o
 - 11) -bencilo,

10 en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R5 es cada uno independientemente

- 15
- 1) -alquilo C₁₋₆,
 - 2) -alqueno C₁₋₆-alqueno C₂₋₆ que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S
 - 3) -alqueno C₁₋₆-alquino C₂₋₆ que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S
 - 4) -L-arilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4
 - 5) -L-heteroarilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4
 - 20 6) -alqueno C₁₋₆-C(O)O-
 - 7) -alqueno C₁₋₆-C(O)OR1
 - 8) -alqueno C₁₋₆-CN
 - 9) -alqueno C₁₋₆-C(O)NR1R3, en el que R1 y R3 opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S; o
 - 25 10) -alqueno C₁₋₆-OH;

R6 es

- 30
- 1) Halógeno
 - 2) OC(O)CF₃ o
 - 3) OC(O)R1;

RA es cada uno independientemente

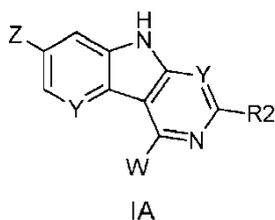
- 35
- 1) -halógeno,
 - 2) -CF₃,
 - 3) -OR1,
 - 4) -L-OR1,
 - 5) -OCF₃,
 - 6) -SR1,
 - 7) -CN,
 - 8) -NO₂,

- 9) -NR1R3,
 10) -L-NR1R1,
 11) -C(O)OR1,
 12) S(O)₂R4
 5 13) -C(O)N(R1)R3,
 14) -NR1C(O)R1,
 15) -NR1C(O)OR1,
 16) -OC(O)N(R1)R3,
 17) -OC(O)R1,
 10 18) -C(O)R4,
 19) -NHC(O)N(R1)R3,
 20) -NR1C(O)N(R1)R3, o
 21) -N₃; y

Rd es cada uno independientemente

- 15 1) -H,
 2) -alquilo C₁₋₆,
 3) -alqueno C₂₋₆,
 4) -alquino C₂₋₆,
 5) -cicloalquilo C₃₋₇,
 20 6) -cicloalqueno C₃₋₇,
 7) -C₁₋₅ perfluorado
 8) -bencilo o
 9) -heterociclilo.

[2]. El método según el punto 1, en el que el compuesto es de fórmula IA



- 25 o una sal o un profármaco del mismo,
 en la que W, Y, Z y R2 son cada uno como se definieron en el punto 1.

[3]. El método según el punto 2, en el que

cada Y se selecciona independientemente de N y CH;

- 30 Z es -CN, -C(O)OR1, -C(O)N(R1)R3, o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,
 W es -CN, -N(R1)R3, -bencilo sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R1, -X-L-(X-L)_n - N(R1)R3, -
 X-L-(X-L)_n-NR1RA o -(N(R1)-L)_n - N⁺R1R3R5 R6
 en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3

y en la que, cuando R1 y R3 están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

cada X es independientemente O, S, o NR1,

- 5 L es cada uno independientemente -alquileo C₁₋₆, -alquenileno C₂₋₆, -alquinileno C₂₋₆, -cicloalquileno C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S o -cicloalquenileno C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S,

en la que el alquileo, el alquenileno, el alquinileno el cicloalquileno y el cicloalquenileno están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con uno o dos sustituyentes R4 o RA;

- 10 R1 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalquenilo C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -heteroarilo, o -bencilo,

en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

- 15 R2 es -H, -alquilo C₁₋₆, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA, -C(O)R4, -L-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4, -L-heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R4, o -L-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4;

R3 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, o -C₁₋₅ perfluorado,

- 20 en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo perfluorado están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R4 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalquenilo C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -arilo, -heteroarilo, o -bencilo,

- 25 en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

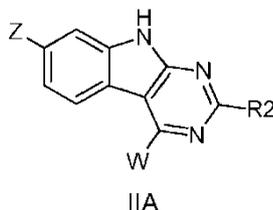
R5 es cada uno independientemente -alquilo C₁₋₆, -L-arilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4, -L-heteroarilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4, -alquileo C₁₋₆-C(O)O-, -alquileo C₁₋₆-C(O)OR1, -alquileo C₁₋₆-CN, -alquileo C₁₋₆-C(O)NR1R3, o -alquileo C₁₋₆-OH;

R6 es halógeno, -OC(O)CF₃ o OC(O)R1;

- 30 RA es cada uno independientemente -halógeno, -CF₃, -OR1, -L-OR1, -OCF₃, -SR1, -CN, -NO₂, -NR1R3, -L-NR1R1, -C(O)OR1, S(O)₂R4, -C(O)N(R1)R3, -NR1C(O)R1, -NR1C(O)OR1, -OC(O)N(R1)R3, -OC(O)R1, -C(O)R4, -NHC(O)N(R1)R3, -NR1C(O)N(R1)R3, o -N₃;

Rd es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalquenilo C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -bencilo o -heterociclilo.

- 35 [4]. El método según el punto 1, en el que el compuesto es de fórmula IIA:



o una sal o un profármaco del mismo,

en la que Z, W y R2 son cada uno como se definieron en el punto 1.

[5]. El método según el punto 4, en el que

- 40 Z es -CN, -C(O)O-alquilo C₁₋₆, -C(O)NH-alquilo C₁₋₆, o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

W es -N(R1)R3, -NR1-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -O-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -S-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -NR1-alquileo

C₁₋₆-NR₁RA, -NR₁-alquileo C₁₋₆-(NR₁-alquileo C₁₋₆)_n-NR₁R₃ o -NR₁-alquileo C₁₋₆-(NR₁-alquileo C₁₋₆)_n-NR₁RA;
 en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3

5 y en la que, cuando R₁ y R₃ están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R₄;

R₁ es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalqueno C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -heteroarilo, o -bencilo,

10 en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R_d;

R₂ es -H, -alquilo C₁₋₆, -C(O)R₄, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄ en el alquileo o el heteroarilo, -alquileo C₁₋₆-heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R₄, o -alquileo C₁₋₆-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄ en el alquileo o el heteroarilo;

R₃ es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, o -C₁₋₅ perfluorado,

15 en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, alquilo perfluorado están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R_d;

R₄ es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalqueno C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -arilo, -heteroarilo, o -bencilo,

20 en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R_d;

RA es cada uno independientemente -halógeno, -CF₃, -OR₁, -L-OR₁, -OCF₃, -SR₁, -CN, -NO₂, -NR₁R₃, -L-NR₁R₁, -C(O)OR₁, S(O)₂R₄, -C(O)N(R₁)R₃, -NR₁C(O)R₁, -NR₁C(O)OR₁, -OC(O)N(R₁)R₃, -OC(O)R₁, -C(O)R₄, -NHC(O)N(R₁)R₃, -NR₁C(O)N(R₁)R₃, o -N₃;

25 R_d es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalqueno C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -bencilo o -heterociclilo.

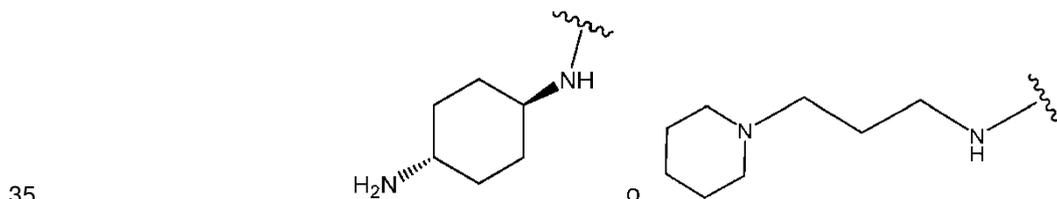
[6]. El método según el punto 5, en el que

Z es CO₂Me o 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo;

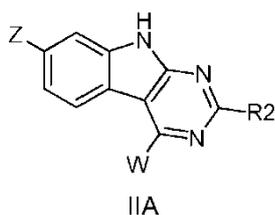
R₂ es bencilo, o H; y

30 W es NH-L-N(R₁)R₃ en la que L es alquileo C₂₋₄ o cicloalquileo C₃₋₇ y R₁ y R₃ es alquilo C₁₋₄ o H; o R₁ y R₃ están unidos junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 3 a 7 miembros, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R₄.

[7]. El método según el punto 6, en el que W es



[8]. El método del punto 1, en el que el compuesto es de fórmula IIA



o una sal del mismo,

en la que

Z es -C(O)O-alquilo C₁₋₄, o -heteroarilo, preferiblemente un anillo heteroarilo de 5 miembros que comprende 2-4 heteroátomos seleccionados de N y O, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

5 W es -N(R1)R3, -NR1-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -O-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -S-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, o -NR1-alquileo C₁₋₆-(NR1-alquileo C₁₋₆)_n-NR1R3, en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3 y en la que, cuando R1 y R3 están unidos al mismo átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5 a 6 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N y O, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

10 R1 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, o -heterociclilo,

en la que el alquilo, el cicloalquilo, el heterociclilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R2 es -H, -alquilo C₁₋₆, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el heteroarilo; o -alquileo C₁₋₆-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el arilo;

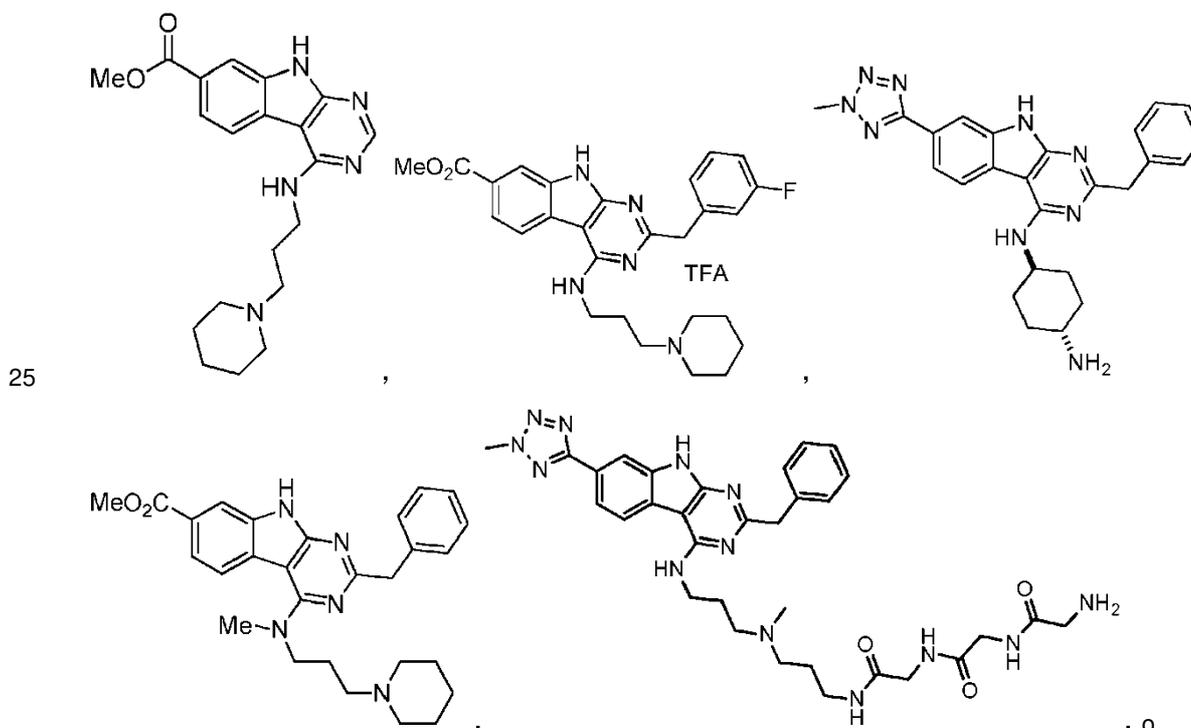
15 R3 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, en el que el grupo alquilo está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

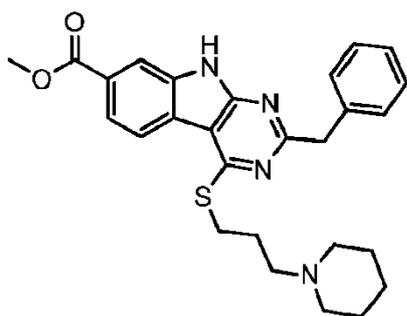
R4 es cada uno independientemente H, -alquilo C₁₋₆, en el que el alquilo está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

20 RA es cada uno independientemente -halógeno, -CF₃, -OR1, -OCF₃, -SR1, -CN, -NO₂, -NR1R3, -C(O)OR1, S(O)₂R4, -C(O)N(R1)R3, -NR1C(O)R1, -NR1C(O)OR1, -OC(O)N(R1)R3, -OC(O)R1, -C(O)R4, -NHC(O)N(R1)R3, o -NR1C(O)N(R1)R3, y

Rd es cada uno independientemente -H, o -alquilo C₁₋₆.

[9]. El método del punto 1, en el que dicho compuesto es:





o una sal del mismo.

[10]. El método de cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que dichas células comprenden células madre y/o células progenitoras.

[11]. El método del punto 10, en el que dichas células madre comprenden células hematopoyéticas primitivas.

5 [12]. El método del punto 11, en el que dichas células hematopoyéticas primitivas se obtienen de sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica.

[13]. El método de cualquiera de los puntos 1 a 12, en el que dicho vector viral es un vector viral deficiente en integración.

[14]. El método de cualquiera de los puntos 1 a 13, en el que dicho vector viral es un vector lentiviral.

10 [15]. El método del punto 14, en el que dicho vector lentiviral es un vector lentiviral seudotipado.

[16]. El método del punto 15, en el que el vector lentiviral se seudotipa con una proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) o una proteína de la envoltura de RAD114.

[17]. El método de cualquiera de los puntos 1 a 16, en el que dichas células se ponen en contacto con dicho compuesto antes de dicha transducción.

15 [18]. El método de cualquiera de los puntos 1 a 16, en el que dichas células se ponen en contacto con dicho compuesto antes y durante dicha transducción.

[19]. El método de cualquiera de los puntos 1 a 18, en el que dichas células se ponen en contacto con dicho compuesto durante un periodo de alrededor de 2 a alrededor de 22 horas.

20 Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción no limitante de las realizaciones específicas de la misma, proporcionadas a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos:

25 La Figura 1 muestra que las células de sangre de cordón umbilical (SCU) CD34⁺ humanas expandidas con el Compuesto 1 (Comp. 1) y SR1 se transdujeron de manera más eficaz que las células sin manipular. Las células de SCU CD34⁺ expandidas con el Comp. 1 (35 nM) y SR1 (500 nM) frescas o de 8 días se preestimularon durante 24 horas y se transdujeron con un lentivirus VSV-G que codificaba GFP con una MOI de 10 durante 16 horas, respectivamente. Las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpos anti-CD34 y CD45RA humanos para el análisis mediante FACS después de 72 horas tras la transducción. Se presenta el porcentaje de células transducidas con GFP en total (barras de la izquierda), poblaciones CD34⁺ (barras intermedias) y CD34⁺CD45RA⁻ (barras de la derecha) en ambas condiciones (células frescas frente a cultivo de 8 días con el Comp. 1+SR1).

35 La Figura 2 muestra que las células tratadas con el Comp. 1 mostraron porcentajes mayores de células CD34⁺ y CD34⁺CD45RA transducidas con GFP en comparación con los controles de DMSO. Las células de SCU CD34⁺ se preestimularon durante 48 horas y se transdujeron con lentivirus VSV-G o RDT114 que codificaba GFP (MOI: 50 o 100) durante 12 horas en presencia de vehículo (DMSO) o Comp. 1 (35 nM), respectivamente. Las células se lavaron después y se cultivaron de nuevo con DMSO o Comp. 1. Se llevó a cabo un análisis mediante citometría de flujo para determinar las células positivas para GFP (gris oscuro) dentro de la población indicada después de 3 y 10 días tras la transducción.

40 Las Figuras 3A y 3B muestran que las células de SCU CD34⁺ transducidas con GFP y expandidas con el Comp. 1 exhibieron un mejor potencial de injerto de células CD45 humanas en comparación con los controles. La progenie de 1000 células de SCU CD34⁺ transducidas y expandidas durante 10 días con el Comp. 1 (triángulos) o controles de DMSO (círculos) (descrito en la Figura 2) se trasplantó en ratones NSG hembra irradiados de manera subletal (275

cGy). Se llevó a cabo un análisis mediante citometría de flujo de células de médula ósea de ratones NSG después de 30 semanas tras el trasplante. Figura 3A: Porcentajes de células CD45+ humanas en las células de MO de NSG totales. Figura 3B: Se muestran las células GFP+ en las células CD45 humanas.

5 La Figura 4 muestra un resumen de los datos *in vivo* 30 semanas tras el trasplante con vectores lentivirales RD114 y VSV-G pseudotipados.

10 La Figura 5A muestra el esquema del diseño experimental. 20.000 células de sangre de cordón umbilical CD34+ aisladas mediante FACS se preestimularon durante 16 horas en 100 microlitros de un medio sin suero [medio de Iscove complementado con albúmina de suero bovino, insulina y transferrina (BIT, STEMCELL Technologies), 10 µg/ml de lipoproteína de baja densidad (LDL, STEMCELL Technologies), 2-mercaptoetanol 10⁻⁴ M (Sigma-Aldrich), glutamax 500 10⁻⁴ M (STEMCELL Technologies), penicilina-estreptomina], más factores de crecimiento humanos (100 ng/ml de SCF, 100 ng/ml de FLT3L, 20 ng/ml de IL-3, 20 ng/ml de IL-6 y 20 ng/ml de G-CSF) en presencia o ausencia del Comp. 1 (35 nM) y/o SR1 (0,75 µM). Las células se expusieron después durante 6 horas a un vector lentiviral GFP (10⁶ UI/mL) en el mismo medio. (Los detalles del vector lentiviral y de la generación y titulación de las reservas virales usadas se proporcionan en la Figura 5C). Al final del periodo de transducción, las células se lavaron y se cultivaron durante 72 horas en el mismo medio complementado con DMSO, SR1 (0,75 µM), Comp. 1 (35 nM), o SR1+Comp. 1. Al final de los medios de cultivo, las células se recogieron, se tiñeron para CD34 y se analizaron mediante citometría de flujo.

La Figura 5B muestra la proporción en porcentaje de células CD34+ que fueron GFP+ (*p<0,05).

20 La Figura 5C muestra los detalles del vector lentiviral y la generación y titulación de las reservas virales usadas en los experimentos descritos en la presente memoria. Se usó el esqueleto del vector lentiviral *pCCI-c-MNDUSpgkGFP* o *pCCI-c-MNDUSpgkYFP* en estos estudios (Logan AC et al., Human Gene Therapy 2004). El cADN de los genes de fusión de 4000 pb de *MN1* o 1743 pb de *NUP98-HOXD13* o 1640 pb de *NUP98-HOXA10hd* se clonó para generar *pCCI-c-MNDUSMN1pgkGFP* o *pCCI-c-MNDUSFND13pgkGFP* o *pCCI-c-MNDUSNA10hdpgkGFP*, respectivamente. Se verificó la secuencia de las construcciones de los vectores. Se produjeron virus recombinantes de título elevado pseudotipados con glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular mediante transfección transitoria de células 293T con el uso de un sistema estándar de empaquetamiento de 4 plásmidos. Los sobrenadantes que contenían virus se concentraron mediante ultracentrifugación para alcanzar títulos de 0,5 x 10⁹ a 5 x 10⁹ unidades infecciosas/ml. Se determinaron los títulos virales transduciendo células HeLa con tres diluciones del vector lentiviral.

30 La Figura 6A muestra un esquema del diseño experimental. Se preestimularon 20.000 células de sangre de cordón umbilical CD34+ aisladas mediante FACS y se transdujeron con un vector lentiviral de GFP en las condiciones de cultivo descritas en la Figura 5A. Se añadió el Comp. 1 (35 nM) o DMSO durante la preestimulación o durante el periodo de transducción. Las transducciones de células se llevaron a cabo mediante el uso de un lentivirus de GFP diluido para cubrir un intervalo de concentraciones virales finales que oscilaron de 10⁵ a 10⁹ viriones/mL (los detalles del virus se proporcionan en la Figura 5C).

35 Las Figuras 6B y 6C muestran la transferencia génica analizada en células CD34+ después del cultivo con células expuestas al Comp. 1 (barras superiores) o DMSO (barras inferiores) durante el periodo de preestimulación (Figura 6B) o el periodo de transducción (Figura 6C) en función de la concentración viral usada.

40 Las Figuras 6D y 6E muestran la eficacia de la transferencia génica en diferentes subgrupos de células hematopoyéticas humanas con el Comp. 1 o DMSO presentes durante el periodo de preestimulación (Figura 6D) o el periodo de transducción (Figura 6E).

Las Figuras 6F y 6G muestran el rendimiento de los subgrupos hematopoyéticos humanos con el Comp. 1 o DMSO presentes durante el periodo de preestimulación (Figura 6F) o el periodo de transducción (Figura 6G). Los datos para las Figuras 6D-6G se obtuvieron con concentraciones virales de 10⁶ UI/mL.

45 La Figura 7A muestra el diseño experimental para analizar el efecto del Comp. 1 sobre la transferencia génica y el rendimiento de células primitivas analizadas *in vitro* e *in vivo*; las células se transdujeron con GFP o YFP para permitir el seguimiento *in vivo* de las células transducidas en las diferentes condiciones cuando se co-inyectaron en ratones inmunodeficientes receptores (repoblación competitiva). Las condiciones de cultivo, los números de células y los virus usados son como se describen en las Figuras 5A y 5C, respectivamente. Para estos experimentos se añadió el Comp. 1 a una concentración final de 35 nM, y las concentraciones virales para los vectores GFP o YFP fueron 10⁶ UI/mL. Todos los cultivos se establecieron por triplicado.

Las Figuras 7B y 7C muestran el análisis representativo mediante citometría de flujo de CD34 y la expresión de GFP o YFP en las células recuperadas 3 días después de la transducción con virus GFP (Figura 7B) o YFP (Figura 7C) en presencia o ausencia del Comp. 1.

55 La Figura 7D muestra la eficacia de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas transducidas con un vector GFP (izquierda, barras de color gris oscuro) o vector YFP (derecha, barras de color gris claro) (n=3; las barras de error indican la DE; * P < 0,05).

La Figura 7E muestra el número absoluto de células CD34+ y células CD34+ marcadas con GFP (izquierda, barras de color gris oscuro) o células CD34+ marcadas con YFP (derecha, barras de color gris claro) recuperadas al final del cultivo de 3 días (n=3; las barras de error indican la DE; * P < 0,05).

- 5 Las Figuras 7F, 7G y 7H muestran los resultados de los experimentos de competición *in vivo* para las células transducidas en presencia o ausencia del Comp. 1. Inmediatamente después del periodo de preestimulación y de transducción (22 hrs), una alícuota igual (20000) de células marcadas con YFP (transducidas en presencia del Comp. 1) y células marcadas con GFP (transducidas en presencia de DMSO) se lavó y se inyectó en ratones NSG irradiados de manera subletal (n=8). El injerto linfomieloide en los aspirados de médula ósea se monitorizó a lo largo de 30 semanas. Figura 7F: Detección de las células CD45+ humanas totales (línea negra superior), células YFP+ (línea gris clara intermedia) o GFP+ (línea gris oscura inferior) en la médula ósea de los ratones NSG trasplantados. Figura 7G: Detección de células CD33+ humanas (mieloides) (barra negra superior), células YFP+ (barra gris clara intermedia) o GFP+ (barra gris oscura inferior) en la médula ósea de los ratones NSG trasplantados. Figura 7H: Detección de células CD19/20 humanas (linfoides B) (barra negra superior), células YFP+ (barra gris clara intermedia) o GFP+ (barra gris oscura inferior) en la médula ósea de ratones NSG trasplantados.
- 10
- 15 Las Figuras 8A a 8E muestran un experimento independiente (Exp. 2) que muestra que el Comp. 1 estimuló el incremento de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas (*in vitro*) y HSCs humanas en ratones NSG (*in vivo*, n=2). El diseño experimental fue como se describe en la Figura 7 en las condiciones de cultivo que se describen en la Figura 5. Las concentraciones virales y las concentraciones del Comp. 1 fueron como se describe en la Figura 7 (106 UI/ml y 35 nM, respectivamente).
- 20 La Figura 8A muestra la eficacia de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas transducidas con un vector GFP (izquierda, barras de color gris oscuro) o un vector YFP (derecha, barras de color gris claro).
- La Figura 8B muestra el número absoluto de células CD34+ y células CD34+ marcadas con GFP (izquierda, barras de color gris oscuro) o células CD34+ marcadas con YFP (derecha, barras de color gris claro) recuperadas al final de un cultivo de 3 días.
- 25 La Figura 8C muestra la detección de células CD45+ humanas (línea negra superior), células GFP+ (línea gris oscura intermedia) o YFP+ (línea gris clara inferior) en la médula ósea de ratones NSG trasplantados en función del tiempo tras el trasplante.
- La Figura 8D muestra la detección de células CD33 humanas (mieloides) (línea negra superior), células GFP+ (línea gris oscura intermedia) o YFP+ (línea gris clara inferior) en la médula ósea de ratones NSG trasplantados.
- 30 La Figura 8E muestra la detección de células CD19/20 humanas (linfoides B) (línea negra superior), células GFP+ (línea gris oscura intermedia) o YFP+ (línea gris clara inferior) en la médula ósea de ratones NSG trasplantados.
- Las Figuras 9A a 9D muestran un experimento independiente (Exp. 3) que muestra que el Comp. 1 estimuló el incremento de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas (*in vitro*) y HSCs humanas en ratones NSG.
- 35 La Figura 9A muestra el esquema del diseño experimental. Las características únicas de este experimento incluyen el uso de una mezcla de sangre de cordón umbilical diferente como fuente de células CD34+; el uso de una preparación lentiviral de GFP diferente; y la determinación de las células *in vivo* en una dilución límite en vez de en un ensayo competitivo. Otras condiciones de cultivo, que incluyen las concentraciones de virus y de Comp. 1, son como se describieron previamente.
- La Figura 9B muestra la eficacia de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas.
- 40 La Figura 9C muestra las células CD45+ humanas en la médula ósea de ratón a las 30 semanas tras el trasplante con dosis variables de células (todas presentadas como equivalentes de las células iniciales).
- La Figura 9D muestra la proporción de células humanas que expresan GFP en la médula ósea a las 30 semanas tras el trasplante con dosis variables de células.
- 45 La Figura 10A muestra el diseño experimental en el que las células de SCU CD34+ se expusieron al Comp. 1 durante diferentes tiempos durante el periodo de preestimulación o transducción. El tiempo de exposición mínimo fue de 2 hrs al comienzo del periodo de preestimulación, o al comienzo o al final del periodo de transducción.
- La Figura 10B muestra un análisis mediante citometría de flujo representativo de las células recuperadas al final del cultivo de expansión de 3 días (en ausencia de Comp. 1) para analizar la transferencia génica y el rendimiento de células CD34+ en diversas condiciones.
- 50 Las Figuras 10C a 10P resumen las eficacias de la transferencia génica y los rendimientos para diversos subcompartimentos de CD34+ cuando estuvo presente el Comp. 1 durante las primeras 2 horas de preestimulación (Figuras 10C, 10H y 10M), durante las últimas 2 horas de preestimulación (Figuras 10D, 10I y 10N), durante las 16 horas de preestimulación (Figuras 10E, 10J y 10O), durante las primeras 2 horas de transducción (Figuras 10F, 10K y 10P) o durante las últimas 2 horas de transducción (Figuras 10G, 10L y 10Q).

La Figura 11A muestra el diseño experimental en el que las células se expusieron directamente al virus sin preestimulación anterior en presencia o ausencia del Comp. 1 para las duraciones indicadas.

5 La Figura 11B muestra el análisis mediante citometría de flujo representativo de las células recuperadas al final del periodo de cultivo. Los paneles posteriores resumen la transferencia génica y los rendimientos en células CD34+ y subpoblaciones CD34+ en las diversas condiciones de transducción marcadas como I, II y III.

10 La Figura 12A muestra el diseño experimental en el que las células CD34+ humanas de médula ósea y células CD34+ humanas de sangre periférica movilizada se preestimularon durante 24 horas y se transdujeron durante 24 horas en un medio sin suero complementado con 100 ng/mL de hSCF, 100 ng/mL de hFLT3-L, 100 ng/mL de hTPO y 20 ng/mL de hIL3 en presencia del Comp. 1 (35 nM) o DMSO (0,01%). Después las células se lavaron y se cultivaron durante 3 días adicionales para analizar la eficacia de la transferencia génica y el rendimiento de células CD34+ y subgrupos CD34+ en los cultivos.

Las Figuras 12B y 12C muestran la eficacia de la transferencia génica y los rendimientos de las células transducidas para subgrupos diferentes de células hematopoyéticas humanas primitivas de médula ósea (Figuras 12B) y sangre periférica movilizada (Figuras 12C).

15 La Figura 13A muestra la eficacia de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas transducidas mediante el uso de un vector lentiviral seudotipado RD114.

La Figura 13B muestra la eficacia de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas transducidas mediante el uso de un vector lentiviral seudotipado VSV-G.

20 La Figura 13C muestra el diseño experimental para ensayar la eficacia de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas mediante un lentivirus sin integración (deficiente en integrasa).

La Figura 13D muestra los resultados de la transferencia génica en células de sangre de cordón umbilical CD34+ en presencia o ausencia del Comp. 1 mediante el uso de un lentivirus sin integración (deficiente en integrasa) (panel B).

25 Las Figuras 14A y 14B muestran los resultados de los experimentos de transferencia génica llevados a cabo con diferentes combinaciones de factores de crecimiento. Se preestimularon 20000 células de SCU CD34+ y se transdujeron en SFM en las condiciones habituales empleadas en todos los experimentos previos con 5 factores de crecimiento (100 ng/ml de SCF, 100 ng/ml de FLT3L, 20 ng/ml de IL-3, 20 ng/ml de IL-6 y 20 ng/ml de G-CSF) o con un cóctel diferente de 3 factores de crecimiento (100 ng/ml de SCF, 100 ng/ml de FLT3L, 50 ng/mL de TPO) complementados con el Comp. 1 (35 nM) o DMSO (0,01%). Las células se lavaron y se cultivaron en los mismos medios durante 3 días adicionales para analizar la eficacia de la transferencia génica y los rendimientos para las células CD34+ y los subgrupos CD34+ en condiciones con 3 factores de crecimiento (3 GFS, paneles de la izquierda) frente a 5 factores de crecimiento (5 GFS, paneles de la derecha). Figura 14A: Eficacia de la transferencia génica (% de células GFP); Figura 14B: Recuento celular absoluto.

30

35 Las Figuras 15A a 15D muestran los resultados de los experimentos de transferencia génica llevados a cabo mediante el uso de un espectro de vectores lentivirales. Se preestimularon células CD34+ humanas durante 16 horas y se transdujeron con diferentes vectores lentivirales durante 6 horas con o sin Comp. 1 en las condiciones habituales, y se estudió la transferencia génica en las células CD34+ después de 72 horas adicionales. Se generaron vectores lentivirales que portaban una diversidad de insertos diferentes (LGB, NA10-HD, MN1, ND13, Figuras 15A a 15D, respectivamente) y se ensayaron a las concentraciones virales indicadas.

40 Las Figuras 16A y 16B muestran los resultados de los experimentos de transferencia génica llevados a cabo con variantes del Comp. 1. Se preestimularon células de SCU CD34+ humanas (16 horas) y se transdujeron (6 horas) en presencia de DMSO, Comp. 1 o diferentes variantes del Comp. 1. Después se lavaron las células y se cultivaron durante 3 días adicionales, y se analizaron mediante FACS. El Comp. 1 y otras variantes del Comp. 1 (Comp. 3, Comp. 4, Comp. 5, Comp. 6) que se sabe que son activos para la expansión de las células CD34+ humanas, pero no las variantes inactivas del Comp. 1 (Comp. 7, Comp. 8) incrementan la eficacia de la transferencia génica en células de SCU CD34+ humanas (Figura 16A) y diferentes subgrupos de CD34+ (Figura 16B).

45

50 Las Figuras 17A a 17C muestran la expansión y el injerto de células CD34+ de sangre de cordón umbilical de macaco después del co-cultivo ± Comp. 1, Compuesto 2 (Comp. 2), y SR1. Figura 17A: esquema experimental. La Figura 17B muestra la detección de células CD45+ de primate en la sangre de ratones trasplantados después del trasplante. La Figura 17C muestra los datos de injerto resumidos a las 10 semanas tras el trasplante (panel superior) y un análisis mediante citometría de flujo representativo (semana 10) (panel inferior). Nivel de significación: *p <0,05.

55 Las Figuras 18A a 18G muestran el efecto del Comp. 1 sobre la transducción y expansión de células CD34+ y células similares a LT-HSC modificadas genéticamente de médula ósea de macaco. Figura 18A: esquema experimental. La Figura 18B muestra la expansión de células CD34+ y la formación de CFC antes y tras la expansión con el Comp. 1/SR1. La Figura 18C muestra el rendimiento celular tras la transducción de células CD34+ +/- Comp. 1. La Figura 18D muestra la cinética de la expansión de células similares a LT-HSC con modificación genética tras la transducción de células CD34+ de médula ósea movilizadas 1 semana tras la transducción. La Figura 18E muestra la expansión en

proporción de células transducidas +/- Comp. 1/SR1 (panel superior; barras de la izquierda = GFP⁺ totales; barras intermedias = CD34⁺ GFP⁺; barras de la derecha = LT-HSC⁺ GFP⁺) y el potencial de CFC de las células CD34⁺ de médula ósea movilizadas transducidas tras la expansión +/- Comp. 1/SR1 (panel inferior). La Figura 18F muestra que la combinación Comp. 1/SR1 mantiene los blastos durante la transducción de las células CD34⁺ movilizadas en comparación con SR1. La Figura 18G muestra imágenes representativas de citocentrifugación para los datos mostrados en la Figura 18F.

Las Figuras 19A a 19E muestran el injerto de células CD34⁺ transducidas expandidas con SR1/Comp. 1 en un macaco. Figura 19A: esquema experimental. La Figura 19B muestra la transferencia génica en células CD34⁺ transducidas con SR1 (barra de la izquierda) y SR1 + Comp. 1 (barra de la derecha). La Figura 19C muestra la expansión en proporción de células CD34⁺ modificadas genéticamente tras el co-cultivo con SR1 (barras de la izquierda) y SR1 + Comp. 1 (barras de la derecha). La Figura 19D muestra la detección de células mieloides y linfoides en médula y sangre 1 mes tras el trasplante de células. La Figura 19E muestra la detección de granulocitos y linfocitos modificados genéticamente tras el trasplante (granulocitos GFP⁺ = rombos de color gris claro; linfocitos GFP⁺ = círculos de color gris claro; granulocitos mCherry⁺ = rombos de color gris oscuro; linfocitos mCherry⁺ = círculos de color gris oscuro).

Las Figuras 20A a E muestran la cooperación entre el Comp. 1 y Rapamicina para incrementar la eficacia de la transferencia génica lentiviral en las células hematopoyéticas humanas.

La Figura 20A muestra un esquema del diseño experimental. 20.000 células de sangre de cordón umbilical CD34⁺ aisladas mediante FACS se preestimularon durante 16 horas en 100 microlitros de medio sin suero más factores de crecimiento humanos (100 ng/ml de SCF, 100 ng/ml de FLT3L, 20 ng/ml de IL-3, 20 ng/ml de IL-6 y 20 ng/ml de G-CSF) en presencia o ausencia del Comp. 1 (35 nM) y/o Rapamicina (10 µg/mL). Las células se expusieron después durante 6 horas a un vector lentiviral GFP (10⁶ UI/mL) en el mismo medio. Al final del periodo de transducción, las células se lavaron y se cultivaron durante 72 horas en medio sin suero con factores de crecimiento. Al final del cultivo, las células se recogieron, se tiñeron para los marcadores superficiales de HSCs y se analizaron mediante citometría de flujo.

La Figura 20B muestra la eficacia de la transferencia génica en HSCs humanas. Barras a la izquierda = DMSO; segundas barras = Comp. 1; terceras barras = rapamicina; cuartas barras (derecha) = Comp. 1 + rapamicina (combinación).

La Figura 20C muestra el número total de células recuperadas al final del cultivo. Barras a la izquierda = DMSO; segundas barras = Comp. 1; terceras barras = rapamicina; cuartas barras (derecha) = Comp. 1 + rapamicina (combinación).

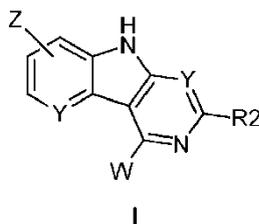
La Figura 20D muestra el número absoluto de HSCs producidas en el cultivo. Barras a la izquierda = DMSO; segundas barras = Comp. 1; terceras barras = rapamicina; cuartas barras (derecha) = Comp. 1 + rapamicina (combinación).

La Figura 20E muestra el análisis mediante citometría de flujo representativo de las células recuperadas al final del cultivo.

Descripción de la invención

En los estudios descritos en la presente memoria, los presentes inventores han demostrado que la exposición a corto plazo (p.ej., alrededor de 2 a 22 horas) de las células hematopoyéticas humanas a ciertos derivados de pirimido[4,5-b]indol, que se ha demostrado que estimulan la expansión de las células hematopoyéticas humanas tras un cultivo prolongado (12 días), incrementa significativamente la transferencia génica mediada por virus. Esta capacidad de incrementar la transferencia génica mediada por lentivirus no se observó con StemRegenin 1 (SR1), otra molécula pequeña que se sabe que estimula la expansión de las células hematopoyéticas humanas primitivas. Este incremento se midió en células hematopoyéticas primitivas de diferentes fuentes (que incluyeron sangre de cordón umbilical, médula ósea de adulto y sangre periférica movilizada de adulto), y de diferentes fenotipos (CD34⁺ en bruto, así como subgrupos de CD34⁺ altamente purificados que incluyeron los altamente enriquecidos en células madre), y con diferentes tipos de virus (diferentes lentivirus, que incluyeron un lentivirus deficiente en integración y diferentes lentivirus seudotipados), lo que indicó que estos compuestos pueden ser aplicables en líneas generales al incremento de la transferencia génica viral en células, tales como células hematopoyéticas.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para transducir un vector viral (p.ej., un vector lentiviral) en células (p.ej., células primarias tales como células madre y/o progenitoras), y dicho método comprende poner en contacto dichas células *in vitro* con un compuesto de fórmula general I como se define en la presente memoria; y transducir dichas células con un vector viral,



o una sal o un profármaco del mismo,

en la que:

cada Y se selecciona independientemente de N y CH;

- 5 Z es -CN; -C(O)OR1; -C(O)N(R1)R3; -C(O)R1; o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4, en la que, cuando (R1) y R3 están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

- 10 W es -CN; -N(R1)R3; -C(O)OR1; -C(O)N(R1)R3; -NR1C(O)R1; -NR1C(O)OR1; -OC(O)N(R1)R3; -OC(O)R1; -C(O)R1; -NR1C(O)N(R1)R3; -NR1S(O)₂R1; -bencilo sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R1; -X-L-(X-L)_n; -N(R1)R3; -X-L-(X-L)_n - heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 unidos en uno o los dos grupos L y heterociclilo; -X-L-(X-L)_n - heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 unidos en uno o los dos grupos L y heterociclilo; -X-L-(X-L)_n- arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4; -X-L-(X-L)_n-NR1RA o -(N(R1)-L)_n - N⁺R1R3R5 R6⁻, en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, 3, 4, o 5,

y en la que, cuando R1 y R3 están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

cada X se selecciona independientemente de O, S, y NR1;

- 20 L es cada uno independientemente -alquileo C₁₋₆; -alquenileno C₂₋₆; -alquinileno C₂₋₆; -cicloalquileo C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S; o cicloalquenileno -C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, en la que los grupos alquileo, alquenileno, alquinileno, cicloalquileo y cicloalquenileno están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con uno o dos sustituyentes R4 o RA;

- 25 R1 es cada uno independientemente -H; -alquilo C₁₋₆; -alquenilo C₂₋₆; -alquinilo C₂₋₆; -cicloalquilo C₃₋₇; -cicloalquenilo C₃₋₇; -C₁₋₅ perfluorado; -heterociclilo; -arilo; -heteroarilo; o -bencilo, en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

- 30 R2 es -H; -alquilo C₁₋₆, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA; -C(O)R4; -L-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4; -L-heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R4; o -L-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4;

- 35 R3 es cada uno independientemente -H; -alquilo C₁₋₆; -alquenilo C₂₋₆; -alquinilo C₂₋₆; -cicloalquilo C₃₋₇; -cicloalquenilo C₃₋₇; -C₁₋₅ perfluorado; -heterociclilo; -arilo; -heteroarilo; o -bencilo, en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R4 es cada uno independientemente -H; -alquilo C₁₋₆; -alquenilo C₂₋₆; -alquinilo C₂₋₆; -cicloalquilo C₃₋₇; -cicloalquenilo C₃₋₇; -C₁₋₅ perfluorado; -heterociclilo; -arilo; -heteroarilo, o -bencilo; en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

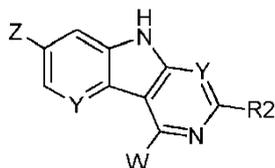
- 40 R5 es cada uno independientemente -alquilo C₁₋₆; -alquileo C₁₋₆-alquenilo C₂₋₆ que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S; -alquileo C₁₋₆-alquinilo C₂₋₆ que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S; -L-arilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4; -L-heteroarilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4; -alquileo C₁₋₆-C(O)O-; -alquileo C₁₋₆-C(O)OR1; -alquileo C₁₋₆-CN; -alquileo C₁₋₆-C(O)NR1R3, en el que R1 y R3 opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S; o -alquileo C₁₋₆-OH;

R6 es halógeno; -OC(O)CF₃; o -OC(O)R1;

RA es cada uno independientemente -halógeno; -CF₃; -OR₁; -L-OR₁; -OCF₃; -SR₁; -CN; -NO₂; -NR₁R₃; -L-NR₁R₁; -C(O)OR₁; -S(O)₂R₄; -C(O)N(R₁)R₃; -NR₁C(O)R₁; -NR₁C(O)OR₁; -OC(O)N(R₁)R₃; -OC(O)R₁; -C(O)R₄; -NHC(O)N(R₁)R₃; -NR₁C(O)N(R₁)R₃; o -N₃; y

- 5 Rd es cada uno independientemente -H; -alquilo C₁₋₆; -alqueno C₂₋₆; -alquino C₂₋₆; -cicloalquilo C₃₋₇; -cicloalqueno C₃₋₇; -C₁₋₅ perfluorado; -bencilo; o -heterociclilo.

De acuerdo con una realización, el compuesto es de fórmula IA



IA

o una sal o un profármaco del mismo,

en la que W, Y, Z y R₂ son cada uno como se definen en la presente memoria.

- 10 De acuerdo con una realización, el compuesto es de fórmula I o IA en la que

cada Y se selecciona independientemente de N y CH;

Z es -CN, -C(O)OR₁, -C(O)N(R₁)R₃, o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄,

W es -CN, -N(R₁)R₃, -bencilo sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R₁, -X-L-(X-L)_n - N(R₁)R₃, -X-L-(X-L)_n-NR₁RA o -(N(R₁)-L)_n - N⁺R₁R₃R₅ R₆⁻

- 15 en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3

y en la que, cuando R₁ y R₃ están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R₄;

X es cada uno independientemente O, S, o NR₁,

- 20 L es cada uno independientemente -alquileo C₁₋₆, -alquenileo C₂₋₆, -alquiniileo C₂₋₆, -cicloalquileo C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S o -cicloalqueniileo C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S

en la que el alquileo, el alqueniileo, el alquiniileo el cicloalquileo y el cicloalqueniileo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con uno o dos sustituyentes R₄ o RA;

- 25 R₁ es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalqueno C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -heteroarilo, o -bencilo,

en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R_d;

- 30 R₂ es -H, -alquilo C₁₋₆, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA, -C(O)R₄, -L-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄, -L-heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R₄, o -L-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄;

- 35 R₃ es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, o -C₁₋₅ perfluorado, en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, alquilo perfluorado están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R_d;

R₄ es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalqueno C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -arilo, -heteroarilo, o -bencilo,

- 40 en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R_d;

R₅ es cada uno independientemente -alquilo C₁₋₆, -L-arilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R₄, -L-heteroarilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R₄, -alquileo C₁₋₆-C(O)-, -alquileo C₁₋

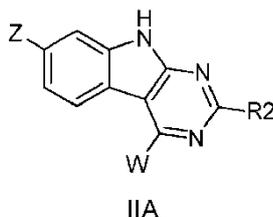
6-C(O)OR1 , -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-CN}$, -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-C(O)NR1R3}$, o -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-OH}$;

R6 es halógeno, OC(O)CF_3 o OC(O)R1 ;

5 RA es cada uno independientemente -halógeno, $-\text{CF}_3$, $-\text{OR1}$, $-\text{L-OR1}$, $-\text{OCF}_3$, $-\text{SR1}$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NR1R3}$, $-\text{L-NR1R1}$, $-\text{C(O)OR1}$, $\text{S(O)}_2\text{R4}$, $-\text{C(O)N(R1)R3}$, $-\text{NR1C(O)R1}$, $-\text{NR1C(O)OR1}$, $-\text{OC(O)N(R1)R3}$, $-\text{OC(O)R1}$, $-\text{C(O)R4}$, $-\text{NHC(O)N(R1)R3}$, $-\text{NR1C(O)N(R1)R3}$, o $-\text{N}_3$;

Rd es cada uno independientemente $-\text{H}$, -alquilo C_{1-6} , -alquenido C_{2-6} , -alquinilo C_{2-6} , -cicloalquilo C_{3-7} , -cicloalquenido C_{3-7} , $-\text{C}_{1-5}$ perfluorado, -bencilo o -heterociclilo.

De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA



10 o una sal o un profármaco del mismo,

en la que Z, W y R2 son cada uno como se definen en la presente memoria.

De acuerdo con una realización, el compuesto es de fórmula I, IA o IIA

Z es $-\text{CN}$; $-\text{C(O)O}$ -alquilo C_{1-6} ; $-\text{C(O)NH}$ -alquilo C_{1-6} ; o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

15 W es $-\text{N(R1)R3}$; $-\text{NR1}$ -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-N(R1)R3}$; $-\text{O}$ -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-N(R1)R3}$; $-\text{S}$ -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-N(R1)R3}$; $-\text{NR1}$ -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-NR1RA}$; $-\text{NR1}$ -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-(NR1-alquileo } \text{C}_{1-6}\text{)}_n\text{-NR1R3}$; o $-\text{NR1}$ -alquileo $\text{C}_{1-6}\text{-(NR1-alquileo } \text{C}_{1-6}\text{)}_n\text{-NR1RA}$

en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3

20 y en la que, cuando R1 y R3 están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

R1 es cada uno independientemente $-\text{H}$; -alquilo C_{1-6} ; -alquenido C_{2-6} ; -alquinilo C_{2-6} ; -cicloalquilo C_{3-7} ; -cicloalquenido C_{3-7} ; $-\text{C}_{1-5}$ perfluorado; -heterociclilo; -heteroarilo; o -bencilo,

25 en la que los grupos alquilo, alquenido, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenido, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R2 es $-\text{H}$; -alquilo C_{1-6} ; $-\text{C(O)R4}$; -alquileo C_{1-6} -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el heteroarilo; -alquileo C_{1-6} -heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R4; o -alquileo C_{1-6} -arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el heteroarilo

30 R3 es cada uno independientemente $-\text{H}$; -alquilo C_{1-6} ; -alquenido C_{2-6} ; -alquinilo C_{2-6} ; o $-\text{C}_{1-5}$ perfluorado, en la que los grupos alquilo, alquenido, alquinilo, alquilo perfluorado están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

35 R4 es cada uno independientemente $-\text{H}$; -alquilo C_{1-6} ; -alquenido C_{2-6} ; -alquinilo C_{2-6} ; -cicloalquilo C_{3-7} ; -cicloalquenido C_{3-7} ; $-\text{C}_{1-5}$ perfluorado; -heterociclilo; -arilo; -heteroarilo; o -bencilo, en la que los grupos alquilo, alquenido, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenido, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

RA es cada uno independientemente -halógeno, $-\text{CF}_3$; $-\text{OR1}$; $-\text{L-OR1}$; $-\text{OCF}_3$; $-\text{SR1}$; $-\text{CN}$; $-\text{NO}_2$; $-\text{NR1R3}$; $-\text{L-NR1R1}$; $-\text{C(O)OR1}$; $\text{S(O)}_2\text{R4}$; $-\text{C(O)N(R1)R3}$, $-\text{NR1C(O)R1}$, $-\text{NR1C(O)OR1}$, $-\text{OC(O)N(R1)R3}$, $-\text{OC(O)R1}$; $-\text{C(O)R4}$; $-\text{NHC(O)N(R1)R3}$; $-\text{NR1C(O)N(R1)R3}$; o $-\text{N}_3$

40 Rd es cada uno independientemente $-\text{H}$; -alquilo C_{1-6} ; -alquenido C_{2-6} ; -alquinilo C_{2-6} ; -cicloalquilo C_{3-7} ; -cicloalquenido C_{3-7} ; $-\text{C}_{1-5}$ perfluorado; -bencilo; o -heterociclilo.

De acuerdo con otra realización, la presente descripción proporciona un método para incrementar la eficacia de la transferencia génica lentiviral en células hematopoyéticas primitivas, y dicho método comprende poner en contacto una población de células *in vitro* que comprenden células hematopoyéticas primitivas con un compuesto de las

fórmulas generales I-VI; y transducir dichas células con un vector lentiviral, y el compuesto es de fórmula I, IA o IIA

Z es CN, -C(O)O-alquilo C₁₋₆, -C(O)NH-alquilo C₁₋₆, o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

5 W es -N(R1)R3, -NR1-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -O-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -S-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -NR1-alquileo C₁₋₆-NR1RA, -NR1-alquileo C₁₋₆-(NR1-alquileo C₁₋₆)_n-NR1R3 o -NR1-alquileo C₁₋₆-(NR1-alquileo C₁₋₆)_n-NR1RA en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3

y en la que, cuando R1 y R3 están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos (N, O o S), y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

10 R1 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalqueno C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -heteroarilo, o -bencilo,

en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

15 R2 es -H, -alquilo C₁₋₆, -C(O)R4, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el heteroarilo, -alquileo C₁₋₆-heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R4, o -alquileo C₁₋₆-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el heteroarilo;

20 R3 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, o -C₁₋₅ perfluorado, en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, alquilo perfluorado están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R4 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalqueno C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -arilo, -heteroarilo, o -bencilo,

25 en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

RA es cada uno independientemente -halógeno, -CF₃, -OR1, -L-OR1, -OCF₃, -SR1, -CN, -NO₂, -NR1R3, -L-NR1R1, -C(O)OR1, S(O)₂R4, -C(O)N(R1)R3, -NR1C(O)R1, -NR1C(O)OR1, -OC(O)N(R1)R3, -OC(O)R1, -C(O)R4, -NHC(O)N(R1)R3, -NR1C(O)N(R1)R3, o -N₃

30 Rd es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalqueno C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -bencilo o -heterociclilo.

En una realización, Z es -C(O)OR1, o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R1, R2 es H, -alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o -L-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4, W es -N(R1)R3 en la que R1 es cicloalquilo C₃₋₇ sustituido con RA y R3 es H.

35 En una realización, Z es -C(O)O-alquilo C₁₋₄ o un anillo heteroarilo de 5 miembros, y dicho heteroarilo comprende 2-4 heteroátomos (N o O), R2 es H, o -L-arilo sustituido opcionalmente con halógeno, OR1, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con RA, C(O)R4, -heterociclilo, C(O)OR4 o alquino C₂₋₆, W es -N(R1)R3 en la que R1 es ciclohexilo sustituido con RA, y R3 es H.

En una realización, Z es COOMe, COOEt, tetrazol u oxadiazol.

40 En una realización, R2 es = H, o -CH₂-arilo sustituido opcionalmente con halógeno, OR1, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con RA, C(O)R4, -heterociclilo, C(O)OR4 o alquino C₂₋₆, en el que dicho arilo es fenilo.

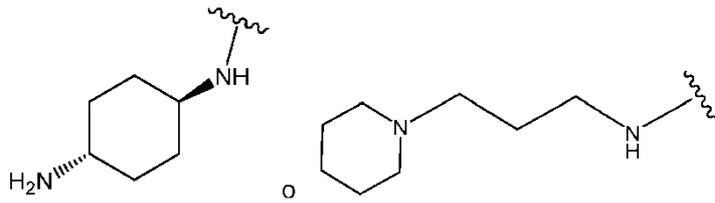
En una realización, R2 es H, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo o -alquileo C₁₋₆-arilo, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4.

De acuerdo con otra realización, el compuesto es de Fórmula I, IA o IIA en la que Z es CO₂Me o 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo;

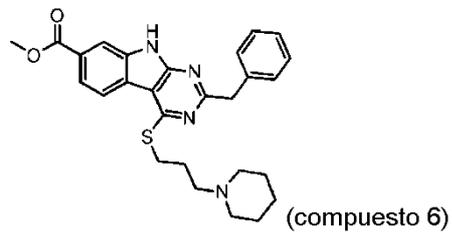
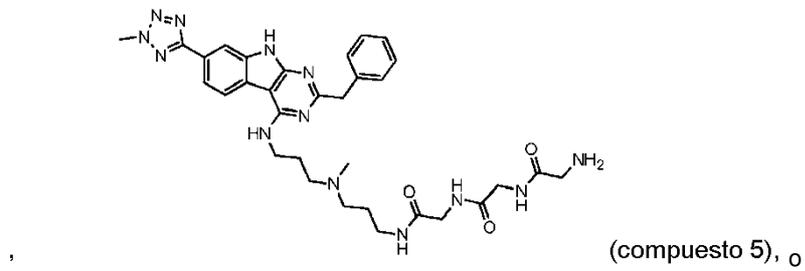
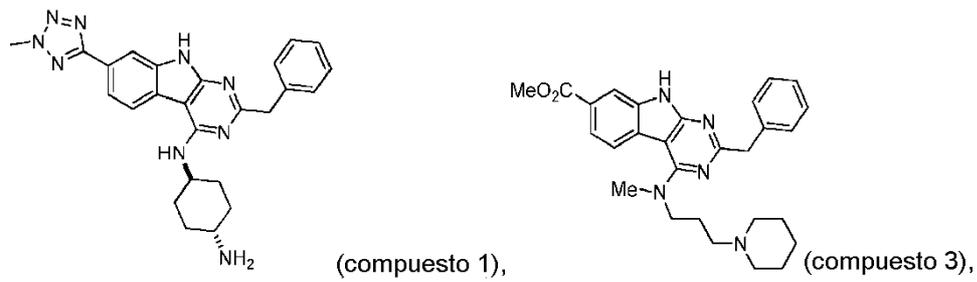
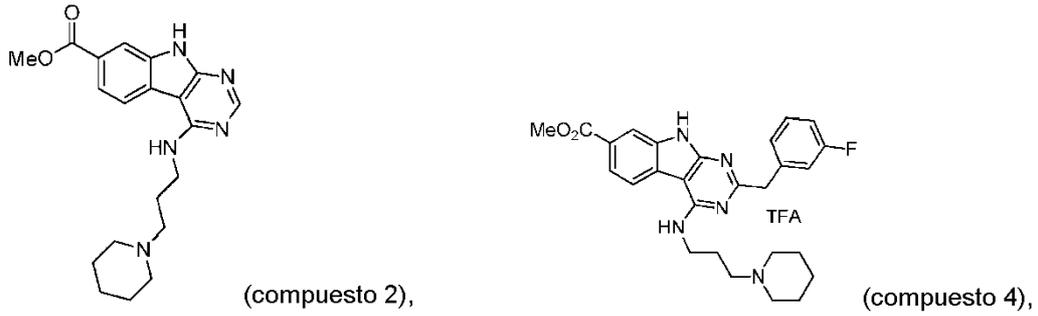
45 R2 es bencilo, o H; y

W es NH-L-N(R1)R3 en la que L es alquileo C₂₋₄ o cicloalquileo C₃₋₇ y R1 y R3 es alquilo C₁₋₄ o H; o R1 y R3 están unidos junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 3 a 7 miembros, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4.

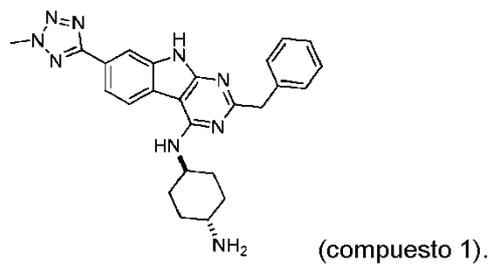
De acuerdo con otra realización, el compuesto es de Fórmula I, IA o IIA en la que W es



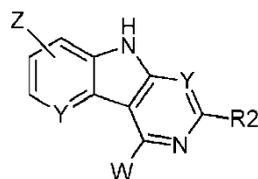
En una realización adicional, el compuesto es



En una realización adicional, el compuesto es

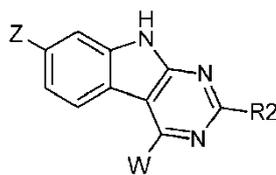


De acuerdo con otra realización, el compuesto es



I

o preferiblemente



IIA

o una sal del mismo,

en la que

- 5 en la fórmula I, cada Y es igual o diferente, y se selecciona independientemente de N y CH

Z es -C(O)O-alquilo C₁₋₄, o -heteroarilo, preferiblemente un anillo heteroarilo de 5 miembros que comprende 2-4 heteroátomos seleccionados de N y O, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

W es -N(R1)R3, -NR1-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -O-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -S-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, o -NR1-alquileo C₁₋₆-(NR1-alquileo C₁₋₆)_n-NR1R3

- 10 en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3

y en la que, cuando R1 y R3 están unidos al mismo átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5 a 6 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N y O, opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

R1 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, o -heterociclilo,

- 15 en la que el alquilo, el cicloalquilo, el heterociclilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R2 es -H, -alquilo C₁₋₆, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el heteroarilo; o -alquileo C₁₋₆-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el arilo;

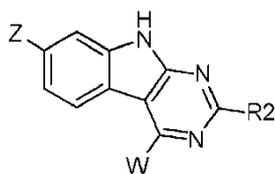
- 20 R3 es cada uno independientemente -H, o -alquilo C₁₋₆, en el que el grupo alquilo está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R4 es cada uno independientemente -H, o -alquilo C₁₋₆, en el que el alquilo está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

- 25 RA es cada uno independientemente -halógeno, -CF₃, -OR1, -OCF₃, -SR1, -CN, -NO₂, -NR1R3, -C(O)OR1, S(O)₂R4, -C(O)N(R1)R3, -NR1C(O)R1, -NR1C(O)OR1, -OC(O)N(R1)R3, -OC(O)R1, -C(O)R4, -NHC(O)N(R1)R3, o -NR1C(O)N(R1)R3, y

Rd es cada uno independientemente -H, o -alquilo C₁₋₆.

De acuerdo con otra realización, el compuesto es



IIA

- 30 o una sal del mismo,

en la que

Z es -C(O)O-alquilo C₁₋₄, o -heteroarilo, preferiblemente un anillo heteroarilo de 5 miembros que comprende 2-4 heteroátomos seleccionados de N y O, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

W es -N(R1)R3, -NR1-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -O-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, -S-alquileo C₁₋₆-N(R1)R3, o -NR1-alquileo C₁₋₆-(NR1-alquileo C₁₋₆)_n-NR1R3

en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3

- 5 y en la que, cuando R1 y R3 están unidos al mismo átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5 a 6 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N y O, opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

R1 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, o -heterociclilo,

en la que el alquilo, el cicloalquilo, el heterociclilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

- 10 R2 es -H, -alquilo C₁₋₆, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el heteroarilo; o -alquileo C₁₋₆-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4 en el alquileo o el arilo;

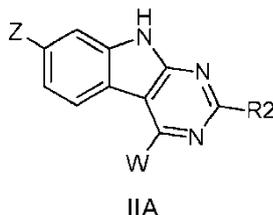
R3 es cada uno independientemente -H, o -alquilo C₁₋₆, en el que el grupo alquilo está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

- 15 R4 es cada uno independientemente -H, o -alquilo C₁₋₆, en el que el alquilo está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

RA es cada uno independientemente -halógeno, -OR1, -NR1R3, -C(O)OR1, -C(O)N(R1)R3, -NR1C(O)R1, -NR1C(O)OR1, o -NR1C(O)N(R1)R3, y

Rd es cada uno independientemente -H, o -alquilo C₁₋₆.

- 20 De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA



o una sal del mismo,

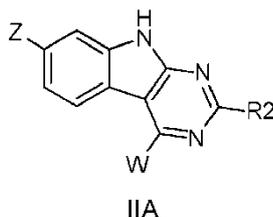
en la que

- 25 Z es -C(O)O-alquilo C₁₋₄ o un anillo heteroarilo de 5 miembros, y dicho heteroarilo comprende 2-4 heteroátomos seleccionados de N y O;

R2 es H, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo o -alquileo C₁₋₆-arilo, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4;

- 30 W es -X-L-N(R1)R3 (en el que X se selecciona independientemente de O, S, y NR1) o preferiblemente -NR1-L-N(R1)R3 en el que L es alquileo C₂₋₄ o cicloalquileo C₃₋₇ y R1 y R3 son alquilo C₁₋₄ o H; o R1 y R3 están unidos junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 3 a 7 miembros, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4.

De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA



- 35 o una sal del mismo,

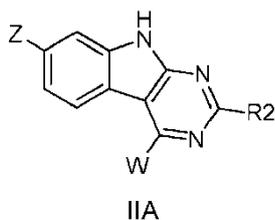
en la que

Z es CO₂Me, COOEt, tetrazol u oxadiazol, preferiblemente Z es CO₂Me o 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo;

R₂ es H, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo o -alquileo C₁₋₆-arilo, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄, preferiblemente R₂ es bencilo, o H;

5 W es -X-L-N(R₁)R₃ (en el que X se selecciona independientemente de O, S, y NR₁) o preferiblemente -NH-L-N(R₁)R₃ en el que L es alquileo C₂₋₄ o cicloalquileo C₃₋₇ y R₁ y R₃ son alquilo C₁₋₄ o H; o R₁ y R₃ están unidos junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 3 a 7 miembros, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R₄.

De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA

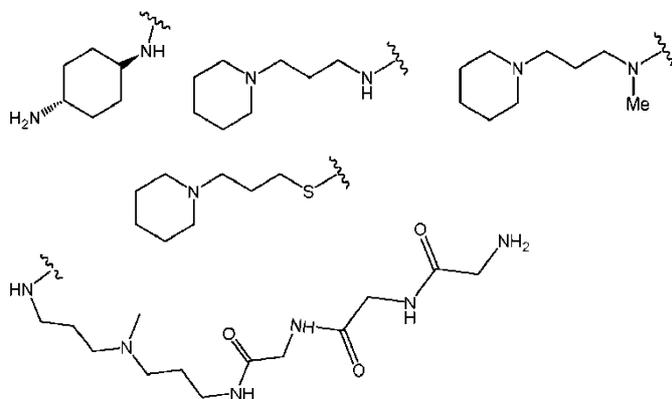


10 o una sal del mismo,
en la que

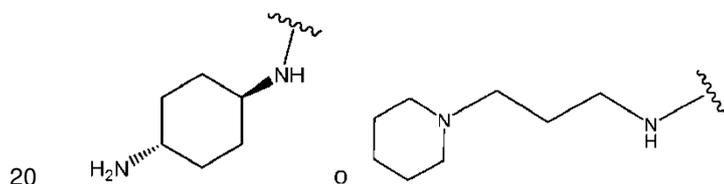
Z es COOMe, COOEt, tetrazol u oxadiazol, preferiblemente Z es CO₂Me o 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo;

15 R₂ es H, -alquileo C₁₋₆-heteroarilo (en el que el heteroarilo es piridinilo, pirimidinilo o tienilo) o -alquileo C₁₋₆-arilo, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄, preferiblemente R₂ es bencilo sustituido opcionalmente, o H;

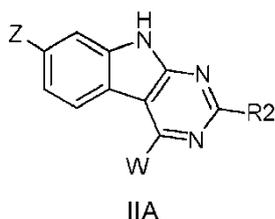
W es



o preferiblemente



De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA



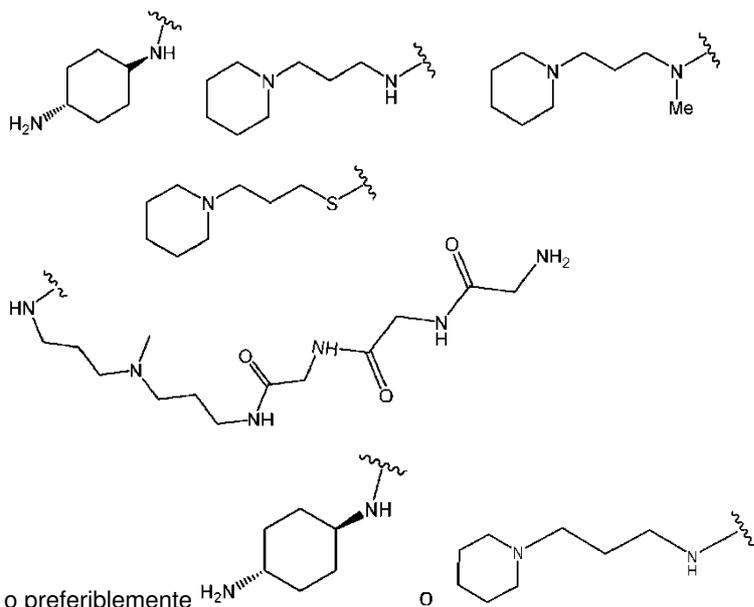
o una sal del mismo,

en la que

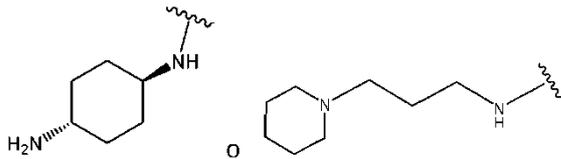
Z es CO₂Me o 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo;

5 R2 es H, -CH₂-heteroarilo (en el que el heteroarilo es piridinilo, pirimidinilo o tienilo) o bencilo sustituido opcionalmente, o H;

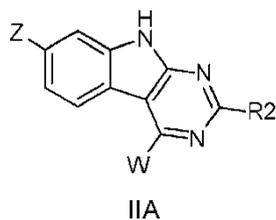
W es



o preferiblemente



10 De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA



o una sal del mismo,

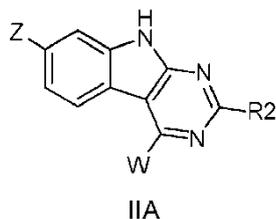
en la que

Z es -C(O)OR1, o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R1,

15 R2 es H, -alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o -L-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

W es X-L-N(R1)R3 (en el que X se selecciona independientemente de O, S, y NR1) o preferiblemente -N(R1)R3 en el que R1 es cicloalquilo C₃₋₇ sustituido con RA y R3 es H.

De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA



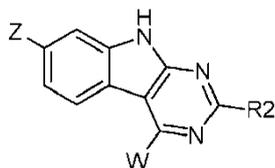
20

o una sal del mismo,

en la que Z es -C(O)O-alquilo C₁₋₄ o un anillo heteroarilo de 5 miembros, y dicho heteroarilo comprende 2-4 heteroátomos seleccionados de N y O; R₂ es H, o -L-arilo sustituido opcionalmente con halógeno, OR₁, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con RA, C(O)R₄, -heterociclilo, C(O)OR₄ o alquililo C₂₋₆; W es X-L-N(R₁)R₃ (en el que X se selecciona independientemente de O, S, y NR₁) o preferiblemente -N(R₁)R₃ en el que R₁ es ciclohexilo sustituido con RA, y R₃ es H.

5

De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA

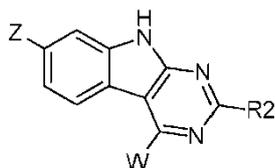


IIA

o una sal del mismo,

10 en la que Z es CO₂Me o 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo; R₂ es bencilo, o H; w es -X-L-N(R₁)R₃ (en el que X se selecciona independientemente de O, S, y NR₁) o preferiblemente -NH-L-N(R₁)R₃ en el que L es alquileno C₂₋₄ o cicloalquileno C₃₋₇ y R₁ y R₃ son alquilo C₁₋₄ o H; o R₁ y R₃ están unidos junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 3 a 7 miembros, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R₄.

De acuerdo con otra realización, el compuesto es de fórmula IIA

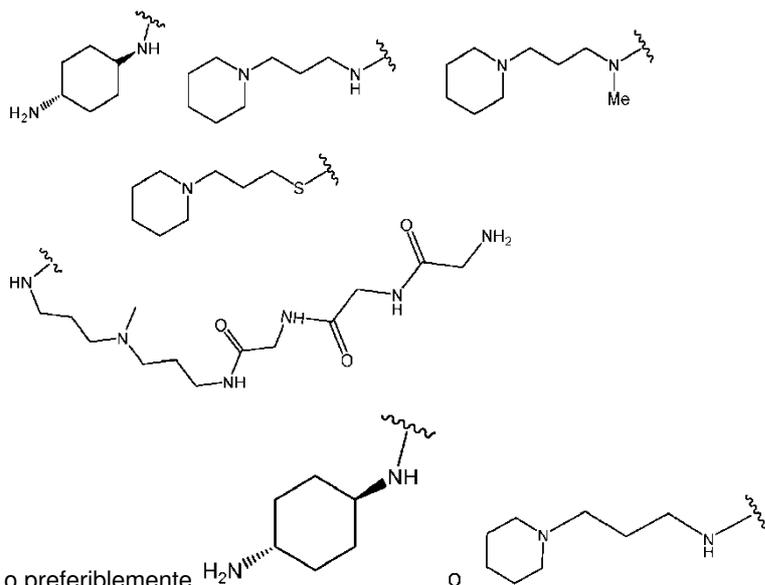


IIA

15

o una sal del mismo,

en la que Z es CO₂Me o 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo; R₂ es bencilo, o H; y W es



20

o preferiblemente

En las realizaciones, el compuesto es uno o más de los compuestos n^os 1 a 90 expuestos en la Tabla 1 más adelante.

Los compuestos de las fórmulas I, II, y IIA, (que incluyen los compuestos representativos expuestos anteriormente) descritos en la presente memoria, que incluyen la preparación y la caracterización de los mismos, se describen en la publicación PCT n^o WO 2013/110198, así como en la sección de metodología sintética detallada más adelante. Estos compuestos se denominan más adelante en la presente memoria "los compuestos definidos en la presente memoria".

25

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" pretende incluir los grupos hidrocarburo alifáticos saturados de cadena tanto ramificada como lineal que tienen el número especificado de átomos de carbono, por ejemplo, se define que C₁-C₆ en alquilo C₁-C₆ incluye grupos que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 carbonos en una disposición saturada lineal o ramificada. Los ejemplos de alquilo C₁-C₆ como se definieron anteriormente incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, i-butilo, pentilo, y hexilo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "cicloalquilo" pretende significar un grupo hidrocarburo alifático saturado monocíclico que tiene el número especificado de átomos de carbono en él, por ejemplo, se define que C₃-C₇ en cicloalquilo C₃-C₇ incluye grupos que tienen 3, 4, 5, 6 o 7 carbonos en una disposición saturada monocíclica. Los ejemplos de cicloalquilo C₃-C₇ como se definió anteriormente incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alqueno" pretende significar grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada insaturados que tienen el número especificado de átomos de carbono en ellos, y en los que al menos dos de los átomos de carbono están unidos entre sí mediante un doble enlace, y que tienen una regioquímica E o Z, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, se define que C₂-C₆ en alqueno C₂-C₆ incluye grupos que tienen 2, 3, 4, 5 o 6 carbonos en una disposición lineal o ramificada, y al menos dos de los átomos de carbono están unidos entre sí mediante un doble enlace. Los ejemplos de alqueno C₂-C₆ incluyen etenilo (vinilo), 1-propenilo, 2-propenilo y 1-butenilo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alquino" pretende significar grupos hidrocarburo de cadena lineal insaturados que tienen el número especificado de átomos de carbono en ellos, y en los que al menos dos átomos de carbono están unidos entre sí mediante un triple enlace. Por ejemplo, se define que alquino C₂-C₄ incluye grupos que tienen 2, 3 o 4 átomos de carbono en una cadena, y al menos dos de los átomos de carbono están unidos entre sí mediante un triple enlace. Los ejemplos de tal alquino incluyen etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "cicloalqueno" pretende significar un grupo hidrocarburo alifático saturado monocíclico que tiene el número especificado de átomos de carbono en él, por ejemplo, se define que C₃-C₇ en cicloalqueno C₃-C₇ incluye grupos que tienen 3, 4, 5, 6 o 7 carbonos en una disposición monocíclica. Los ejemplos de cicloalqueno C₃-C₇ como se definió anteriormente incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo.

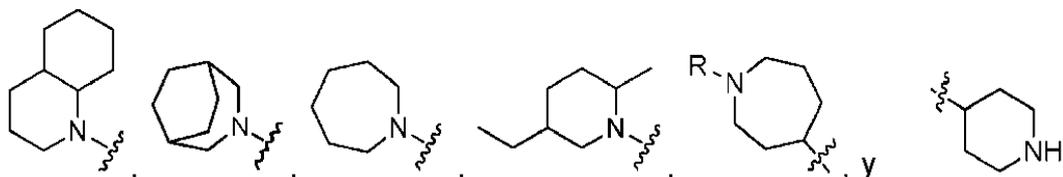
Tal como se usa en la presente memoria, el término "halo" o "halógeno" pretende significar flúor, cloro, bromo o yodo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "haloalquilo" pretende significar un alquilo como se definió anteriormente, en el que cada átomo de hidrógeno puede estar sustituido sucesivamente por un átomo de halógeno. Los ejemplos de haloalquilo incluyen CH₂F, CHF₂ y CF₃.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "arilo", solo o en combinación con otro radical, significa un grupo monocíclico aromático carbocíclico que contiene 6 átomos de carbono que además puede estar condensado con un segundo grupo carbocíclico de 5 o 6 miembros que puede ser aromático, saturado o insaturado. Los ejemplos de arilo incluyen fenilo, indanilo, 1-naftilo, 2-naftilo y tetrahidronaftilo. El arilo se puede conectar con otro grupo en una posición adecuada del anillo cicloalquilo o del anillo aromático.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "heteroarilo" pretende significar un sistema de anillo monocíclico o bicíclico de hasta 10 átomos, en el que 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 por medio de un átomo de carbono del anillo o uno de los heteroátomos. Los ejemplos de heteroarilo incluyen tienilo, bencimidazolilo, benzo[b]tienilo, furilo, benzofuranilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, indolizino, isoindolilo, 3H-indolilo, indolilo, indazolilo, purinilo, 4H-quinolizino, isoquinolilo, quinolilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, isotiazolilo, isocromanilo, cromanilo, isoxazolilo, furazanilo, indolinilo, isoindolinilo, tiazolo[4,5-b]-piridina, tetrazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tienilo, pirimido-indolilo, pirido-indolilo, pirido-pirrol-pirimidinilo, pirrolo-dipiridinilo y derivados de fluoresceína.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "heterociclo", "heterocíclico" o "heterociclilo" pretende significar un sistema de anillo no aromático de 3, 4, 5, 6, o 7 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S. Los ejemplos de heterociclos incluyen pirrolidinilo, tetrahydrofuranilo, piperidilo, 3,5-dimetilpiperidilo, pirrolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, tetrahydro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-2(3H)-ona y diazirinilo, en los que la unión al anillo puede estar en el átomo de nitrógeno o en un átomo de carbono del anillo, tal como se describe a continuación:



Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes" o su expresión equivalente "sustituido opcionalmente con al menos un sustituyente" pretende significar que el evento o circunstancias descritas posteriormente pueden ocurrir o no, y que la descripción incluye los casos en los que el evento o circunstancia ocurre y los casos en los que no ocurre. La definición pretende significar de cero a cinco sustituyentes.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sujeto" o "paciente" pretende significar seres humanos y mamíferos no humanos tales como primates, gatos, perros, cerdos, ganado, ovejas, cabras, caballos, conejos, ratas y ratones.

10 Si los sustituyentes por sí mismos son incompatibles con los métodos sintéticos descritos en la presente memoria, el sustituyente se puede proteger con un grupo protector adecuado (PG) que sea estable en las condiciones de reacción usadas en estos métodos. El grupo protector se puede eliminar en un punto adecuado de la secuencia de reacciones del método para proporcionar un intermedio o compuesto objetivo deseado. Los grupos protectores adecuados y los métodos para proteger y desproteger diferentes sustituyentes mediante el uso de tales grupos protectores adecuados son muy conocidos para los expertos en la técnica; cuyos ejemplos se pueden hallar en T. Greene y P. Wuts, "Protecting Groups in Chemical Synthesis" (4^a ed.), John Wiley & Sons, NY (2007). Los ejemplos de grupos protectores usados incluyen Fmoc, Bn, Boc, CBz y COCF₃. En ciertos 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 que es un sustituyente deseado en un compuesto objetivo.

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

25 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" pretende significar las sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres, que no son indeseables biológicamente o de otra manera, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico, y 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-toluenosulfónico y ácido salicílico.

30 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" pretende significar las sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son indeseables biológicamente o de otra manera. 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 las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso y aluminio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen las sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas que incluyen las aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, 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 y resinas de poliamina.

40 Los compuestos según la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más centros asimétricos, ejes quirales y planos quirales, y pueden dar lugar por tanto a enantiómeros, diastereómeros, y otras formas estereoisoméricas, y se pueden definir desde el punto de vista de la estereoquímica absoluta, tal como (R) o (S) o, como (D) o (L) para los aminoácidos. La presente invención pretende incluir todos los isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (+) y (-), (R) y (S), o (D) y (L) se pueden preparar mediante el uso de sintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver mediante el uso de técnicas convencionales, tales como HPLC en fase inversa. Las mezclas racémicas se pueden preparar y después separar en los isómeros ópticos individuales, o estos isómeros ópticos se pueden preparar mediante síntesis quiral. Los enantiómeros se pueden resolver mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo mediante la formación de sales diastereoisoméricas que después se pueden separar mediante cristalización, cromatografía gas-líquido o cromatografía líquida, y reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico del enantiómero. Los expertos en la técnica apreciarán además que cuando el enantiómero deseado se convierte en otra entidad química mediante una técnica de separación, se requiere una etapa adicional para formar la forma enantiomérica deseada. De manera alternativa, se pueden sintetizar enantiómeros específicos mediante una síntesis asimétrica con el uso de reactivos, sustratos, catalizadores, o disolventes ópticamente activos, o convirtiendo un enantiómero en otro mediante una transformación asimétrica.

- 55 Ciertos compuestos según la invención pueden existir en forma de una mezcla de epímeros. Los epímeros significan diastereoisómeros que tienen la configuración opuesta en solamente uno de dos o más centros estereogénicos presentes en el compuesto respectivo.

Los compuestos según la invención pueden existir en una forma dipolar, y la presente invención incluye las formas dipolares de estos compuestos y las mezclas de los mismos.

Además, los compuestos según la invención también pueden existir 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 las realizaciones de la invención, los compuestos descritos en la presente memoria comprenden alrededor del 10% o menos, alrededor del 9% o menos, alrededor del 8% o menos, alrededor del 7% o menos, alrededor del 6% o menos, alrededor del 5% o menos, alrededor del 4% o menos, alrededor del 3% o menos, alrededor del 2% o menos, alrededor del 1% o menos, alrededor del 0,5% o menos, alrededor del 0,1% o menos en peso de agua. En otras realizaciones, los compuestos descritos en la presente memoria comprenden alrededor del 0,1% o más, alrededor del 0,5% o más, alrededor del 1% o más, alrededor del 2% o más, alrededor del 3% o más, alrededor del 4% o más, alrededor del 5% o más, o alrededor del 6% o más en peso de agua.

Puede ser adecuado o deseable preparar, purificar, y/o manipular el compuesto en forma de un profármaco. Por tanto, el término "profármaco", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que, cuando se metaboliza (p.ej., *in vivo*), proporciona el compuesto activo deseado. En general, el profármaco es inactivo, o menos activo que el compuesto activo deseado, pero puede proporcionar una manipulación, administración, o propiedades metabólicas ventajosas. A menos que se especifique de otra manera, una referencia a un compuesto particular incluye también los profármacos del mismo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "CE₅₀" pretende significar la concentración que da como resultado un incremento del 50% en el recuento de células CD34+CD45RA- en comparación con los cultivos con vehículo (DMSO).

En una realización, se usa una combinación de los compuestos definidos en la presente memoria en los métodos y las composiciones descritas en la presente memoria. En otra realización, los compuestos definidos en la presente memoria se pueden usar en combinación con otros agentes o métodos que se sabe que incrementan la eficacia de la transducción de células hematopoyéticas, por ejemplo fibronectina o fragmentos de fibronectina (CH-296), retronectina, Tat de HIV, vectofusina-1, desoxinucleósidos, citocinas (p.ej., IL-6, SCF, ligando de FLT-3), compuestos que modulan la señalización de prostaglandinas, tales como PGE₂ (véase el documento WO 2014/026110) y/o inhibidores de mTOR (p.ej., rapamicina).

En una realización, las células son células primarias, por ejemplo células cerebrales/neuronales, células de sangre periférica (p.ej., linfocitos, monocitos), células de sangre de cordón umbilical, células de médula ósea, células cardíacas, células endoteliales, células epidérmicas, células epiteliales, fibroblastos, células hepáticas o células pulmonares. En una realización, las células son células de médula ósea, células de sangre periférica o células de sangre de cordón umbilical.

En una realización, las células son células madre. La expresión "células madre", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a células que tienen una pluripotencia que las permite diferenciarse hasta células maduras funcionales. Incluye las células hematopoyéticas primitivas, las células progenitoras, así como las células madre adultas que son células indiferenciadas halladas en diversos tejidos en el cuerpo humano, que pueden renovarse a sí mismas y que dan lugar a tipos celulares especializados y tejidos de los que provienen las células (p.ej., células madre musculares, células madre cutáneas, células madre cerebrales o neuronales, célula madre mesenquimatosas, células madre pulmonares, células madre hepáticas).

En una realización, las células son células hematopoyéticas primitivas. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "células hematopoyéticas primitivas" se usa para referirse a las células que tienen una pluripotencia que las permite diferenciarse hasta células sanguíneas maduras funcionales, tales como granulocitos (p.ej., promielocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), eritrocitos (p.ej., reticulocitos, eritrocitos), trombocitos (p.ej., megacarioblastos, megacariocitos productores de plaquetas, plaquetas), y monocitos (p.ej., monocitos, macrófagos), y que pueden tener o no tener la capacidad de regenerarse a la vez que mantienen su pluripotencia (auto-renovación). Abarca las "células madre hematopoyéticas" o "HSCs", que son células que tienen pluripotencia, que les permite diferenciarse hasta células maduras funcionales tales como granulocitos, eritrocitos, trombocitos, y monocitos, y la capacidad de regenerarse a la vez que mantienen su pluripotencia (auto-renovación), así como células hematopoyéticas pluripotentes que no tienen la capacidad de auto-renovación. En una realización, la población de células comprende HSCs. Las HSCs se pueden obtener del cuerpo o de un órgano del cuerpo que contiene células de origen hematopoyético. Tales fuentes incluyen la médula ósea sin fraccionar (de los fémures, cadera, costillas, esternón, y otros huesos), sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado, timo, linfa y bazo. Todos los productos sanguíneos en bruto o sin fraccionar anteriormente mencionados se pueden enriquecer en células que tienen las características de HSC de maneras conocidas para los expertos en la técnica. Las HSCs se identifican fenotípicamente por su pequeño tamaño, la carencia de marcadores de linaje (lin), tinción baja (población lateral) con colorantes vitales tales como rodamina 123 (rodamina^{DULL}, también denominada rho¹⁰) o Hoechst 33342, y la presencia/ausencia de diversos marcadores antigénicos en su superficie, muchos de los cuales pertenecen a la serie del cúmulo de diferenciación, tales como: CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45 y c-kit.

En una realización, la población de células comprende células madre hematopoyéticas (HSCs).

En una realización, las células son células de mamífero, por ejemplo células humanas.

La expresión "vector viral", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un virus recombinante capaz de transducir las células e introducir su material genético en las células. Los ejemplos de vectores virales que se pueden usar en la terapia génica incluyen retrovirus (lentivirus), adenovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus (virus herpes simplex), alfavirus, y virus vacuna (Poxvirus). En una realización, el vector viral es un vector lentiviral.

5 La expresión "vector lentiviral" se refiere a un vector que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales fuera de las LTRs que se obtienen principalmente de un lentivirus. Los vectores lentivirales son capaces de proporcionar una administración eficaz, integración y expresión a largo plazo de los transgenes en células que no se están dividiendo tanto *in vitro* como *in vivo*. Se conoce una diversidad de vectores lentivirales en la técnica, véase Naldini et al, (1996a, 1996b, y 1998); Zufferey et al, (1997); Dull et al, 1998, pat. de EE.UU. n°s 6.013.516; y 5.994.136, cualquiera de los cuales se puede adaptar para producir un vector de transferencia adecuado para el uso en el método y la composición de la presente invención. Los lentivirus ilustrativos incluyen: HIV (virus de la inmunodeficiencia humana; que incluye el HIV tipo 1, y HIV tipo 2); virus visna-maedi (VMV); el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV). En un aspecto, se prefieren los esqueletos de vectores basados en HIV. En una realización, el vector lentiviral es un lentivirus deficiente en replicación.

Como será evidente para alguien de experiencia en la técnica, la expresión "vector lentiviral" se usa para referirse a una partícula lentiviral que media en la transferencia de ácidos nucleicos. Las partículas lentivirales incluirán en general diversos componentes virales, y a veces también componentes de la célula hospedadora además de ácido(s) nucleico(s). En aspectos particulares, las expresiones "vector lentiviral", "vector de expresión lentiviral" se usan para referirse a plásmidos de transferencia lentivirales y/o partículas lentivirales infecciosas.

En una realización, el vector lentiviral es un vector lentiviral seudotipado. Los vectores lentivirales seudotipados consisten en partículas de vectores que albergan proteínas de la envoltura (glicoproteínas, GP) derivadas de otros virus con envoltura. Tales partículas poseen el tropismo del virus del que derivan las proteínas de la envoltura. Una de las glicoproteínas usadas de manera generalizada para seudotipar vectores lentivirales es la GP del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), debido al tropismo muy amplio y la estabilidad de los seudotipos resultantes. Los vectores lentivirales seudotipados son muy conocidos en la técnica, y se describen varios ejemplos, por ejemplo, en Cronin et al., Curr. Gene Ther. 5(4):387-398. Incluye los vectores lentivirales seudotipados con GPs de lyssavirus, GPs del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), GPs de alfavirus (p.ej. virus Ross River (RRV), virus Semliki Forest (SFV) y virus Sindbis GPs), GPs de Filovirus (p.ej. GPs del virus de Marburg y del virus de Ebola Zaire), GPs de gammaretrovirus (p.ej. GPs de MLV ecotrópico, MLV 4070A anfortrópico, MLV 10A1, MLV NZB xenotrópico, virus formador de focos en células de visón, virus de la leucemia del gibón (GALV), GPs de RD114 y GPs de baculovirus (GP64).

En una realización, el vector viral es un vector viral deficiente en integración, tal como un vector adenoviral sin integración o un lentivirus deficiente en integrasa (IDLV). Los IDLVs se pueden producir por medio del uso de mutaciones en la proteína integrasa, lo que minimiza la integración proviral. El IDLV resultante genera episomas de vectores circulares en las células objetivo transducidas que se pierden gradualmente mediante dilución en las células en división (expresión transitoria), pero son estables en las células en reposo. Intrínsecamente, los IDLVs tienen un riesgo enormemente reducido de provocar mutagénesis por inserción en comparación con los lentivirus con integración. Por lo tanto, los IDLVs pueden ser especialmente útiles para las aplicaciones en las que se requiere una expresión transitoria o para una expresión episómica sostenida, tal como en células en reposo, por ejemplo para las vacunaciones, la terapia del cáncer, las inserciones de genes dirigidas a un sitio, las estrategias de ruptura de genes, y la reprogramación celular. El diseño y las aplicaciones de los IDLVs se describen, por ejemplo, en Shaw y Cornetta, Biomedicine 2014, 2, 14-35.

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores lentivirales que comprenden una secuencia de control de la expresión que dirige la expresión del polinucleótido de interés en un tipo celular o linaje celular particular. El uso de una secuencia de control de la expresión para un tipo celular o linaje celular ofrece ventajas de seguridad en la limitación de la expresión del polinucleótido a una etapa deseada de la diferenciación celular en un único linaje; y, por tanto, los vectores de la invención mitigan la preocupación relacionada con la expresión ectópica de polipéptidos en tipos indeseados de células.

50 En una realización, la secuencia de control de la expresión puede ser una secuencia de control de la expresión específica del tipo celular o del linaje celular que dirige la expresión del polinucleótido de interés en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora hematopoyética, una célula mieloide, una célula linfoide, un linaje trombopoyético, un mastocito, una célula de linaje eritropoyético, una célula de linaje granulopoyético, y una célula de linaje monocitopoyético. En un aspecto, el vector comprende un promotor, potenciador, o promotor/potenciador de células hematopoyéticas unido de manera operable a un gen de interés.

La producción de partículas virales infecciosas y disoluciones de reserva virales se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas convencionales. Los métodos de preparación de disoluciones de reserva virales se conocen en la técnica y se ilustran, p.ej., en Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633, y N. R. Landau et al. (1992) J. Virol. 66:5110-5113.

- En aspectos particulares, se pueden generar partículas virales basadas en HIV-1 coexpresando los elementos de empaquetamiento de viriones y el vector de transferencia en una célula productora. Estas células se pueden transfectar de manera transitoria con varios plásmidos. En general se emplean de tres a cuatro plásmidos, pero el número puede ser mayor dependiendo del grado en el que se dividan los componentes lentivirales en unidades diferentes. Por ejemplo, un plásmido puede codificar los componentes centrales y enzimáticos de los viriones, derivados de HIV-1. Este plásmido se denomina plásmido de empaquetamiento. Otro plásmido codifica en general la(s) proteína(s) de la envoltura, muy habitualmente la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) debido a su estabilidad elevada y amplio tropismo. Este plásmido se puede denominar plásmido de expresión de la envoltura. Otro plásmido codifica el genoma a transferir a la célula objetivo, es decir, el vector propiamente dicho, y se denomina vector de transferencia. Los plásmidos de empaquetamiento se pueden introducir en líneas celulares humanas mediante técnicas conocidas, que incluyen la transfección con fosfato cálcico, lipofección o electroporación. Se pueden generar virus recombinantes con títulos de varios millones de unidades de transducción (o unidades infecciosas, UI) por mililitro (UT/ml) mediante esta técnica y las variantes de la misma. Tras una ultracentrifugación, se pueden obtener reservas concentradas de alrededor de 10^8 UT/ml, 10^9 UT/ml, 10^{10} UT/ml, 10^{11} UT/ml, 10^{12} UT/ml, o alrededor de 10^{13} UT/ml.
- Las partículas infecciosas de virus se pueden recoger a partir de las células de empaquetamiento mediante el uso de técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas se pueden recoger mediante lisis celular, o mediante recogida del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas de virus recogidas se pueden purificar, si se desea. Las técnicas de purificación adecuadas son muy conocidas para los expertos en la técnica.
- Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "transducción" se refiere a la transferencia estable de material genético desde una partícula viral (p.ej., lentiviral) a un genoma de una célula (p.ej., un genoma de una célula hematopoyética primitiva). También abarca la introducción de vectores virales sin integración en las células, lo que conduce a la expresión transitoria o episódica de un gen de interés presente en el vector viral. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "tiempo suficiente para incrementar la eficacia de la transducción" se refiere a un periodo de tiempo en el que se puede cultivar una población de células junto con los compuestos definidos en la presente memoria de forma que, cuando la población de células se pone en contacto con un vector viral, las células se transducen con el vector viral con una eficacia de transducción mayor, definida como el porcentaje de células que se transducen con el vector viral en comparación con una población similar de células que se ponen en contacto con un vector viral similar, en ausencia de los compuestos definidos en la presente memoria. En las realizaciones particulares, el incremento de la eficacia de transducción representa al menos un enriquecimiento de 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces de las células transducidas tratadas con los compuestos definidos en la presente memoria en comparación con las células sin tratar, tratadas solamente con el vector viral.
- Se pueden usar virus para infectar las células *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro* mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando las células, por ejemplo células CD34⁺ o células madre se transducen *ex vivo*, las partículas de vector se pueden incubar con las células mediante el uso de una dosis en general del orden de 1 a 100 o 1 a 50 multiplicidades de infección (MOI), que también corresponde a 1×10^5 a 100 o 50×10^5 unidades de transducción del vector viral por 10^5 células. Esto, por supuesto, incluye una cantidad de vector que corresponde a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50 MOI.
- En una realización, las células, por ejemplo células hematopoyéticas primitivas, se pueden poner en contacto *in vitro* con los compuestos definidos en la presente memoria antes y/o durante la transducción con el vector viral. En una realización, las células, por ejemplo células hematopoyéticas primitivas, se ponen en contacto *in vitro* con los compuestos definidos en la presente memoria antes de la transducción con el vector viral (preestimulación). En un aspecto particular, las células se cultivan con los compuestos definidos en la presente memoria antes de la transducción durante al menos alrededor de 1 hora o 2 horas. En otros aspectos, las células se cultivan con los compuestos definidos en la presente memoria antes de la transducción durante al menos alrededor de 2, 3 o 4 horas. En una realización, las células se cultivan con los compuestos definidos en la presente memoria antes de la transducción durante un periodo de alrededor de 1 a alrededor de 24 horas, alrededor de 2 a alrededor de 24 horas, o alrededor de 2 a alrededor de 22 horas. En las realizaciones adicionales, las células se cultivan con los compuestos definidos en la presente memoria antes de la transducción durante un periodo de alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 horas.
- En otros aspectos, las células se cultivan en presencia de los compuestos definidos en la presente memoria durante la transducción (coestimulación). En un aspecto, las células se cultivan en presencia de los compuestos definidos en la presente memoria durante la transducción (se coestimulan) durante al menos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 24 horas. En ciertos otros aspectos, las células se cultivan en presencia de los compuestos definidos en la presente memoria durante las primeras 24 horas de transducción, o durante las primeras 36 o 48 horas de transducción. Las células se pueden cultivar en presencia de los compuestos definidos en la presente memoria en cualquier momento durante el periodo de transducción, por ejemplo durante las primeras horas (es decir las primeras 2, 3 o 4 horas), al final de la transducción (durante las últimas 2, 3 o 4 horas), y/o en mitad del periodo de transducción.
- En otro aspecto, las células se pueden cultivar en presencia de los compuestos definidos en la presente memoria antes de la transducción (se preestimulan) y durante la transducción (se coestimulan). En un aspecto particular, tras

la transducción, la población de células se puede lavar o tratar de otra manera para eliminar algunos o todos los compuestos definidos en la presente memoria.

La población de células inicial (es decir, la población de células que se pone en contacto con los compuestos definidos en la presente memoria y se transduce) se puede enriquecer basándose en la expresión de ciertos marcadores superficiales celulares, tales como CD34, CD38 y/o CD45RA mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. Así, la población de células inicial se puede enriquecer, por ejemplo, en células CD34⁺, células CD34⁺CD45RA⁻ o células CD34⁺CD38⁻. Además, la población de células inicial se puede usar directamente, o se puede congelar y almacenar para el uso en un momento posterior.

Así, la población de células se puede someter primero a etapas de enriquecimiento o purificación, que incluyen la selección negativa y/o positiva de las células basándose en marcadores celulares específicos (CD34, CD38 y/o CD45RA) para proporcionar la población de células inicial, por ejemplo para proporcionar una población de células inicial enriquecida en HSCs. Los métodos para aislar dicha población de células inicial basándose en marcadores celulares específicos pueden usar la tecnología de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) o un sustrato sólido o insoluble al que están unidos anticuerpos o ligandos que interactúan con los marcadores superficiales celulares específicos. Por ejemplo, las células se pueden poner en contacto con un sustrato sólido (p.ej., columna de microesferas, matraces, partículas magnéticas) que contienen los anticuerpos, y se elimina cualquier célula sin unir. Cuando se usa un sustrato sólido que comprende microesferas magnéticas o paramagnéticas, las células unidas a las microesferas se pueden aislar fácilmente mediante un separador magnético (clasificación magnética de células, MACS®). En una realización, la población de células inicial se enriquece en células CD34⁺. Los métodos para enriquecer una población de células sanguíneas en células CD34⁺ incluyen kits comercializados por Miltenyi Biotec® (kit de aislamiento directo de CD34⁺, Miltenyi Biotec®, Bergisch, Gladbach, Alemania) o mediante Baxter® (Isolex® 3000). Los kits para el enriquecimiento de células progenitoras hematopoyéticas humanas a partir de médula ósea o sangre también están disponibles comercialmente (p.ej., kit de enriquecimiento de células progenitoras hematopoyéticas humanas StemSep™).

En una realización, la población de células inicial se obtiene a partir de células de sangre de cordón umbilical neonatal que se han enriquecido en células CD34⁺. En una realización relacionada, dicha población de células inicial se obtiene a partir de una o dos unidades de sangre de cordón umbilical.

En otra realización, la población de células inicial se obtiene a partir de células de sangre periférica movilizadas humanas que se han enriquecido en células CD34⁺. En una realización, la población de células inicial puede contener preferiblemente al menos un 50% de células CD34⁺, en ciertas realizaciones, más de un 60, 70, 80, 90 o 95% de células CD34⁺.

Antes, durante, y/o tras la transducción, las células se pueden cultivar en medios adecuados para el mantenimiento, el crecimiento, o la proliferación de las células. Las condiciones de cultivo de la población de células variarán dependiendo de diferentes factores, en particular, la población de células inicial. Los medios y las condiciones de cultivo adecuadas se conocen bien en la técnica. El método de la presente invención se puede llevar a cabo en un medio natural, un medio semisintético o un medio sintético desde el punto de vista de la composición, y puede ser un medio sólido, un medio semisólido o un medio líquido desde el punto de vista de la forma, y cualquier medio nutritivo usado para el cultivo de HSCs y/o células progenitoras hematopoyéticas, que se puede complementar con uno o más de los factores descritos anteriores. Tal medio comprende en general sodio, calcio, magnesio, fósforo, cloro, aminoácidos, vitaminas, citocinas, hormonas, antibióticos, suero, ácidos grasos o sacáridos. En el cultivo, se pueden incorporar otros componentes químicos o componentes biológicos por separado o en combinación, según lo requiera el caso. Tales componentes a incorporar en el medio pueden ser suero de ternero fetal, suero humano, suero de caballo, insulina, transferrina, lactoferrina, colesterol, etanolamina, selenito sódico, monoglicérol, 2-mercaptoetanol, albúmina de suero bovino, piruvato sódico, polietilén glicol, diversas vitaminas, diversos aminoácidos, agar, agarosa, colágeno, metilcelulosa, diversas citocinas o diversos factores de crecimiento. Los ejemplos de tal medio basal adecuado para un método de expansión de HSCs incluyen el medio de expansión sin suero (SFEM) StemSpan™ (StemCell Technologies®, Vancouver, Canadá), medio definido H3000 StemSpan™ (StemCell Technologies®, Vancouver, Canadá), CellGro™, SCGM (CellGenix™, Freiburg, Alemania), StemPro™-34 SFM (Invitrogen®), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), mezcla nutritiva de Ham H12, mezcla F12, medio 5A de McCoy, medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio α MEM (medio esencial mínimo de Eagle modificado alfa), medio RPMI1640, medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), StemPro34™ (Invitrogen®), X-VIVO™ 10 (Cambrex®), X-VIVO™ 15 (Cambrex®) y Stemline™ II (Sigma-Aldrich®).

Tras la transducción, las células transducidas se pueden cultivar en condiciones adecuadas para su mantenimiento, crecimiento y/o proliferación. En aspectos particulares, las células transducidas se cultivan durante alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días antes del trasplante.

Las condiciones de cultivo para mantener y/o expandir células hematopoyéticas primitivas, tales como HSCs, se conocen bien en la técnica. En general, las condiciones de cultivo comprenden el uso de factores como citocinas y factores de crecimiento, conocidos en general en la técnica para la expansión de HSCs. Tales citocinas y factores de crecimiento pueden ser moléculas biológicas o pequeñas, e incluyen IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, SCF, FIT3-L, trombopoyetina (TPO), eritropoyetina, y análogos de los mismos. Tal como se usa en la presente memoria,

los "análogos" incluyen cualquier variante estructural de las citocinas y de los factores de crecimiento que tenga la actividad biológica de las formas que se dan de manera natural, lo que incluye las variantes con una actividad biológica incrementada o disminuida en comparación con las formas que se dan de manera natural, o agonistas de receptores de citocinas tales como un anticuerpo agonista hacia el receptor de TPO (por ejemplo, sc(Fv)₂ de VB22B como se detalló en la publicación de patente WO 2007/145227). Las combinaciones de citocinas y factores de crecimiento se eligen para mantener/expandir HSCs y células progenitoras a la vez que se limita la producción de células diferenciadas de manera terminal. En una realización específica, se seleccionan una o más citocinas y factores de crecimiento del grupo que consiste en SCF, Flt3-L y TPO. El medio se puede complementar con factores que estimulan la expansión de HSCs, que incluyen SR1. Además, en vista del hecho de que se ha demostrado que los compuestos definidos en la presente memoria estimulan la expansión de HSCs (véase el documento WO 2013/110198), tales compuestos se pueden añadir además al medio de cultivo durante el periodo de expansión.

Se ha descrito la IL-6 o interleucina-6 humana, también conocida como factor estimulador de células B 2 (Kishimoto, Ann. Review of 1 mm. 23:1 2005), y está disponible comercialmente. Se ha descrito el SCF o factor de células madre humanas, también conocido como ligando de c-kit, factor de crecimiento de mastocitos o factor de Steel (Smith, M A et al., ACTA Haematologica, 105, 3:143, 2001) y está disponible comercialmente. El Flt3-L o ligando de 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 de c-Mpl (Kaushansky K (2006). N. Engl. J. Med. 354 (19): 2034-45) y está disponible comercialmente.

Los componentes químicos y los componentes biológicos mencionados anteriormente se pueden usar no solamente añadiéndolos al medio, sino también inmovilizándolos sobre la superficie del sustrato o soporte usado para el cultivo, específicamente, disolviendo un componente a usar en un disolvente adecuado, revistiendo el sustrato o el soporte con la disolución resultante y después eliminando mediante lavado el exceso del componente. Tal componente a usar se puede añadir al sustrato o soporte revestido de manera preliminar con una sustancia que se une al componente.

Las células hematopoyéticas primitivas, tales como HSCs, se pueden cultivar en un recipiente de cultivo usado en general para el cultivo de células animales tales como una placa Petri, un matraz, una bolsa de plástico, una bolsa de Teflon™, opcionalmente después del revestimiento preliminar con una matriz extracelular o una molécula de adhesión celular. El material para tal revestimiento puede ser colágenos I a XIX, fibronectina, vitronectina, lamininas 1 a 12, nitrógeno, tenascina, trombospondina, factor de von Willebrand, osteopontina, fibrinógeno, diversas elastinas, diversos proteoglicanos, diversas cadherinas, desmogleína, diversas integrinas, E-selectina, P-selectina, L-selectina, superfamilia de inmunoglobulinas, Matrigel®, poli-D-lisina, poli-L-lisina, quitina, quitosano, Sepharose®, gel de ácido alginico, hidrogel o un fragmento de los mismos. Tal material de revestimiento puede ser un material recombinante que tenga una secuencia de aminoácidos modificada de manera artificial. Las células hematopoyéticas primitivas, tales como HSCs, se pueden cultivar usando un biorreactor que puede controlar mecánicamente la composición del medio y el pH, 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 población de células se puede lavar después para eliminar el compuesto o la composición de la invención y/o cualquier otro componente del cultivo celular, y resuspenderla en un medio adecuado de suspensión de células para el uso a corto plazo o en un medio de almacenamiento a largo plazo, por ejemplo un medio adecuado para la criopreservación, por ejemplo DMEM con un 40% de FCS y un 10% de DMSO. Los expertos en la técnica también disponen de otros métodos para preparar reservas congeladas de células cultivadas.

El método de la presente invención puede ser útil para diversas aplicaciones en las que es valiosa una transferencia génica elevada, que incluyen los estudios *in vitro* (p.ej., estudios funcionales de genes, cribados en busca de genes con una función específica, análisis de la expresión génica, edición génica), estudios *in vivo* (p.ej., estudios funcionales, evaluación de aproximaciones de terapia génica).

Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se contempla que se pueden usar los métodos de la presente invención para transducir significativamente más células con significativamente menos virus, y de ese modo se minimiza el riesgo de alteración genómica y/o activación por inserción de proto-oncogenes en el genoma de la célula terapéutica. La minimización del riesgo de activación por inserción de proto-oncogenes y otras alteraciones genómicas en la célula terapéutica es una consideración importante al idear un protocolo adecuado de terapia génica, ya que se minimiza la posibilidad de que se expandan clonalmente *in vivo* células transducidas que comprendan características cancerosas y den lugar a cánceres, tumores u otras enfermedades que implican una proliferación celular anormal. Además, se ha observado en la técnica que la transducción con grandes cantidades de virus en general puede ser citotóxica para la célula transducida. Por tanto, los métodos de la presente invención incrementan adicionalmente la capacidad de supervivencia de las células transducidas. Por lo tanto, la presente invención proporciona una terapia génica más segura y eficaz.

La mención de intervalos de valores en la presente memoria pretende únicamente servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor por separado que se halla dentro del intervalo, a menos que se indique de otra manera en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara

individualmente en la presente memoria. Todos los subgrupos de valores dentro de los intervalos también se incorporan en la memoria descriptiva como si se enumerasen individualmente en la presente memoria.

5 De forma similar, en la presente memoria una estructura química general con diversos sustituyentes y diversos radicales enumerados para estos sustituyentes pretende servir como método abreviado para referirse individualmente a todas y cada una de las moléculas obtenidas mediante la combinación de cualquiera de los radicales para cualquiera de los sustituyentes. Cada molécula individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerase individualmente en la presente memoria. Además, todos los subgrupos de moléculas dentro de las estructuras químicas generales también se incorporan en la memoria descriptiva como si se enumerasen individualmente en la presente memoria.

10 En la presente memoria, la expresión "alrededor de" tiene su significado habitual. La expresión "alrededor de" se usa para indicar que un valor incluye una variación intrínseca de error para el dispositivo o el método que se está empleando para determinar el valor, o abarca valores cercanos a los valores enumerados, por ejemplo dentro de un 10% o 5% de los valores enumerados (o intervalo de valores).

Modo(s) para llevar a cabo la invención

15 La presente invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Materiales y Métodos relacionados con el Ejemplo 1 (Figuras 1 a 4)

Recogida de células de sangre de cordón umbilical CD34⁺ humanas

20 Se aislaron células de sangre de cordón umbilical (SCU) CD34⁺ humanas mediante el uso de un cóctel de pre-enriquecimiento de CD34 RosetteSep™, seguido de una selección positiva de CD34 mediante el uso de EasySep™ (StemCell Technologies).

Cultivo de células CD34⁺

25 Se cultivaron células CD34⁺ humanas en medios de expansión de HSC que consistieron en SFEM StemSpan (StemCell Technologies) complementado con 100 ng/ml de factor de células madre humanas (SCF, R&D Systems), 100 ng/ml de ligando de tirosina quinasa similar a FMS 3 (FLT3, R&D Systems), 50 ng/ml de trombopoyetina (TPO, R&D Systems), y 10 µg/ml de lipoproteínas de baja densidad (StemCell Technologies).

Compuesto

Comp. 1 [35 nM], SR1 (Alichem, 41864) [750 nM] o combinación de Comp. 1 [35 nM] +SR1 [500 nM].

Preparación de vector lentiviral

30 La co-transfección de células HEK293 se llevó a cabo con los plásmidos: pCCL-c-MNDU-eGFP, pCMV-Gag/Pol (PLP1; sigma), pRSV-Rev (PLP2; sigma) y pCMV-VSV/G (PLP; sigma) o pCMV-RDT. El caldo lentiviral se recogió tras 48 horas tras la transfección. Las partículas lentivirales se concentraron mediante precipitación con PEG-it™ (System Biosciences). Se realizó la medida del título de virus en las células HEK293. Para incrementar la transferencia génica mediada por lentivirus, se precargaron lentivirus en una placa revestida de RetroNectina (Takara) según las directrices del fabricante.

35 Transducción de células de SCU CD34⁺ humanas

Las células de SCU CD34⁺ frescas (preestimuladas durante 24 o 48 hr) o cultivadas se transdujeron mediante un virus GFP de envoltura de VSV o RDT con una MOI 10, 50 o 100 durante 12 o 16 horas. Las células se lavaron después y se mantuvieron en cultivo durante 3 o 10 días tras la infección. Se llevó a cabo un análisis mediante FACS para monitorizar el porcentaje de células transducidas con GFP en la población total de CD34⁺ o CD34⁺CD45RA⁻.

40 Citometría de flujo

45 El análisis mediante citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro BD LSR II. Las células de SCU CD34⁺ transducidas con GFP frescas o cultivadas se tiñeron en PBS complementado con un 2% de suero bovino fetal (FBS) a 4 °C durante 15 minutos con anti-CD34 humano marcado con APC (BD Biosciences) y anti-CD45RA humano marcado con PE (BD Biosciences). El análisis de los datos se realizó mediante el uso del programa informático BD FACSDiva™.

Xenotrasplante

50 Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo protocolos aprobados por el Comité para el Cuidado de Animales de la Universidad de Montreal. La progenie de 1000 células de SCU CD34⁺ transducidas o no con GFP expandidas durante 10 días con vehículo (DMSO) o con el Comp. 1 [35 nM] se trasplantó mediante inyección en la vena de la cola a ratones NSG hembra de 8 a 12 semanas de edad (NODScidIL2Rγnull, Jackson Laboratory)

irradiados de manera sub-lethal (250 cGy, <24 hr antes del trasplante). Se monitorizaron las células humanas en la médula ósea (MO) de NSG mediante citometría de flujo 30 semanas tras el trasplante. Se recogieron células de MO de NSG haciendo fluir líquido en los dos fémures, tibias y caderas. Las células se trataron después con tampón de lisis de eritrocitos 1x (StemCell Technologies) y se tiñeron con anti-CD45 humano marcado con Pacific Blue™ (BioLegend), anti-CD45 de ratón marcado con APC-eFluo 780 (eBioscience) para monitorizar la reconstitución de la sangre humana en células de MO en NSG.

Materiales y Métodos relacionados con los Ejemplos 1 a 9 (Figuras 5 a 20)

Vectores virales y producción de virus

A menos que se especifique de otra manera, se usó el esqueleto del vector lentiviral *pCCI-c-MNDUSpgkGFP* o *pCCI-c-MNDUSpgkYFP* en estos estudios (Logan AC et al, Human Gene Therapy 2004). Se verificó la secuencia de las construcciones de los vectores. Se produjeron virus recombinantes de título elevado pseudotipados con glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular mediante transfección transitoria de células 293T con el uso de un sistema estándar de empaquetamiento de 4 plásmidos. Se concentraron los sobrenadantes que contenían virus mediante ultracentrifugación para alcanzar títulos de $0,5 \times 10^9$ a 5×10^9 unidades infecciosas/ml. Se determinaron los títulos virales transduciendo células HeLa con tres diluciones del vector lentiviral. Para los ensayos de una formulación de lentivirus sin integración, se generó un sobrenadante viral (un obsequio del Dr. Donald Kohn, Departamento de Microbiología, Inmunología y Genética Molecular y Departamento de Pediatría, Universidad de California, Los Ángeles) para un vector lentiviral que expresaba GFP bajo control de una LTR del virus del sarcoma mieloproliferativo modificado (MND-GFP-IDLV) mediante el uso de una integrasa catalíticamente inactiva (Joglekar AV et al., Mol Ther., sep. de 2013;21(9):1705-17, PMID 23857176).

Aislamiento y cultivo de células de sangre de cordón umbilical humano, de sangre periférica movilizada y de médula ósea adulta

Se recogieron células de sangre de cordón umbilical (SCU) y de sangre periférica movilizada (SPm) con consentimiento según los procedimientos aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Columbia Británica. Se adquirieron células de médula ósea adulta enriquecidas en CD34⁺ de STEMCELL Technologies. Las células de SCU y SPm CD34⁺ se enriquecieron hasta una pureza >90% primero mediante el uso de un cóctel de preenriquecimiento RosetteSep™ CD34 (STEMCELL Technologies), seguido de selección positiva mediante el uso de microesferas magnéticas (kit EasySep, STEMCELL Technologies). En ciertos casos, se realizó un enriquecimiento adicional mediante clasificación de células CD34⁺ con el uso de un clasificador Influx II (BD Bioscience). Las células de SCU CD34⁺ se preestimularon durante 16 horas en medio sin suero (SFM; medio de Iscove complementado con albúmina de suero bovino, insulina y transferrina (BIT, STEMCELL Technologies), 10 µg/ml de lipoproteína de baja densidad (LDL, STEMCELL Technologies), 2-mercaptoetanol 10^{-4} M (Sigma-Aldrich), glutamax 500 10^{-4} M (STEMCELL Technologies), penicilina y estreptomina) complementado con 100 ng/mL de ligando de FLT3 (FL), 100 ng/mL de factor de Steel (SF), 20 ng/mL de IL-3, IL-6 y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (todos de STEMCELL Technologies). En un experimento, las células de SCU se preestimularon en presencia de solamente 3 factores de crecimiento, 100 ng/mL de FL, 100 ng/mL de SF y 50 ng/mL de TPO (STEMCELL Technologies). Las células CD34⁺ de MO y SPm adultas se preestimularon durante 24 horas en SFM complementado con 100 ng/mL de FL, 100 ng/mL de factor de Steel SF, 100 ng/mL de TPO y 20 ng/mL de IL-3. Las células se preestimularon en presencia o ausencia del Comp. 1 (35 nM), SR1 (0,75 µM) o DMSO (sin superar un 0,01%). En un experimento, también se añadió rapamicina durante la fase de preestimulación (10 µg/mL) con o sin Comp. 1 (35 nM).

Transducción de células CD34⁺ humanas

Al final de la preestimulación, las células se resuspendieron en SFM complementado con factor de crecimiento fresco con lentivirus concentrado (GFP o YFP y en un experimento también se usó virus con globina, NA10HD, MN1, y ND13) y 5 µg/mL de sulfato de protamina, y se incubaron a 37 °C durante 6 horas para las células de SCU y 24 horas para las células de MO y SPm a una concentración de virus de 1×10^6 o 1×10^7 UI/mL, y se colocaron en una placa de 96 pocillos revestida con 5 µg/cm² de fibronectina (Sigma-Aldrich). Las células se transdujeron en presencia o ausencia del Comp. 1 (35 nM), SR1 (0,75 µM) o DMSO (sin superar un 0,01%). En un experimento, las células también se transdujeron en presencia de Rapamicina (10 µg/mL) con o sin Comp. 1 (35 nM). Al final de la infección, las células se lavaron varias veces con PBS y se usaron para los experimentos *in vivo* y se cultivaron durante otras 72 horas adicionales en SFM complementado con factor de crecimiento fresco. Se determinó la eficacia de la transferencia génica en diversos subgrupos de células CD34⁺ después de teñir las células con los siguientes anticuerpos específicos anti-humano (todos de eBioscience a menos que se indique): CD34-APC (clon 8G12, STEMCELL Technologies), CD38-PECy7 (clon HIT2), Thy1-PE (clon eBio5E10), CD45RA-APC780 (clon H1100) y CD49f-EF450 (clon eBioGoH3). Todos los análisis mediante citometría de flujo se llevaron a cabo mediante el uso de un aparato LSR II Fortessa® (BD Biosciences).

Ratones

Se criaron ratones NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} Il2r^{tm1Wj1}/SzJ (NOD/SCID-IL-2r γ -null, NSG) (en un principio obtenidos de Jackson Labs) en el centro de recursos animales del Centro de Investigación del Cáncer de Columbia Británica. Todos

los procedimientos experimentales con ratones se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Consejo Canadiense de Protección Animal con la aprobación de la Universidad de Columbia Británica.

Xenotrasplante y seguimiento *in vivo* de las células humanas transducidas en ratones

5 En los estudios de xenotrasplante, se irradiaron de manera subletal ratones NSG de 8-12 semanas de edad (315 cGy de rayos γ y de ^{137}Cs) 24 horas antes del trasplante. En los ensayos de repoblación competitiva, a cada ratón se le inyectó de manera intravenosa la progenie de 20.000 células de SCU CD34⁺ transducidas en presencia del Comp. 1 y 20.000 en presencia de DMSO. Para el experimento de dilución límite, los ratones recibieron la progenie de 20.000, 4.000 o 800 células de SCU CD34⁺ transducidas en presencia del Comp. 1 o DMSO. Se monitorizó la reconstitución linfomieloide humana en la médula ósea (MO) de NSG a lo largo de 30 semanas mediante aspiración de MO a 3, 12, 20 25 y 30 semanas tras el trasplante, y análisis de FACS de las células humanas que expresaban GFP e YFP. Tras la lisis de los eritrocitos, se incubaron las células de MO con un reactivo de bloqueo (PBS con un 2% de FBS, 5% de suero humano, un anticuerpo anti CD16/CD32 (2.4G2)), y se tiñeron con los siguientes anticuerpos específicos anti-humano: CD45-Alexa Fluor® 700 (clon HI30, Biolegend), CD33-PECY7 (clon WM-53, eBioscience), CD19-PE (clon, HIB19, Biolegend), CD20-PE (clon L27, StemCell Technologies). Se analizó un mínimo de 200.000 células de MO por ratón. Todos los análisis mediante citometría de flujo se llevaron a cabo mediante el uso de un aparato LSRII Fortessa® (BD Biosciences). Todos los datos de citometría de flujo se analizaron mediante el uso del programa informático FlowJo® (Versión 8.8, TreeStar).

Trasplante y seguimiento *in vivo* de células de MO movilizadas de macaco transducidas

20 Las células CD34⁺ de MO movilizadas con G-CSF/SCF se dividieron en dos fracciones. Una fracción se transdujo con lentivirus que expresaba mCherry en presencia de SR1 (1 μM) y citocinas (factor de Steel, FLT3-L y TPO), y la segunda fracción se transdujo con lentivirus que expresaba GFP en presencia de SR1 y Comp. 1 (40 nM) y con las mismas citocinas. Tras la expansión durante 10 días en presencia o ausencia del Comp. 1 (40 nM), las dos fracciones de células modificadas genéticamente se co-infundieron en el macaco donante de HSC original después de que el animal recibiese un precondicionamiento mieloablativo (irradiación de 1020 cGy).

25 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como la media \pm EEM o DE y media geométrica \pm DE. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el uso de la prueba t de Student (para datos emparejados o independientes, según sea adecuado) directamente calculados en Prism GraphPad. Los valores *P <0,05 se consideraron significativos.

30 Ejemplo 1: El Comp. 1 incrementa la eficacia de la transferencia génica lentiviral en las células hematopoyéticas humanas.

35 La Figura 1 muestra que las células de sangre de cordón umbilical (SCU) CD34⁺ humanas expandidas con Comp. 1 y SR1 se transdujeron de manera más eficaz que las células sin manipular. Las células tratadas con Comp. 1 mostraron porcentajes mayores de células CD34⁺ y CD34⁺CD45RA transducidas con GFP en comparación con los controles de DMSO, 3 días y 10 días tras la transducción (Figura 2). Las Figuras 3 y 4 muestran que las células de SCU CD34⁺ transducidas con GFP y expandidas con Comp. 1 mostraron un mejor potencial de injerto de células CD45 humanas en comparación con los controles con DMSO. Además, los datos representados en las Figuras 5A y 5B indican que la exposición a corto plazo de las células hematopoyéticas humanas al Comp. 1 puede incrementar significativamente la transferencia génica mediada por lentivirus en aproximadamente 70%, tal como se estudió 3 días tras la infección en células enriquecidas en células madre/progenitoras CD34⁺ de sangre de cordón umbilical. Esta diferencia fue estadísticamente significativa, y no se observó con SR1, otra molécula pequeña con capacidad de estimular la expansión de las células hematopoyéticas humanas primitivas.

Ejemplo 2: La exposición a corto plazo al Comp. 1 durante solamente el periodo de preestimulación o de transducción fue suficiente para incrementar la transferencia génica mediada por lentivirus en células hematopoyéticas humanas primitivas a lo largo de un amplio intervalo de títulos.

45 Los resultados representados en las Figuras 6A-6G demuestran que el efecto estimulador del Comp. 1 sobre la transferencia génica está presente en un amplio intervalo de títulos virales. El efecto es intenso a las concentraciones virales inferiores. Por ejemplo, la transferencia génica con una concentración viral de 10^5 es equivalente a la alcanzada solamente con concentraciones virales \sim 100 veces mayores en ausencia del Comp. 1. Incluso a las concentraciones virales más altas usadas, hay una transferencia génica incrementada cuando las células se exponen al Comp. 1 durante el periodo de preestimulación o transducción. De manera importante, este efecto es evidente en subgrupos sumamente purificados de células hematopoyéticas, que incluyen CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD45RA⁻ que incluyen las HSCs. De interés adicional, incluso con esta exposición a corto plazo al Comp. 1, hay un incremento adicional del rendimiento de diversas subpoblaciones CD34⁺ que incluyen las células transducidas.

Ejemplo 3: La exposición a corto plazo (22 h) al Comp. 1 incrementa la transferencia génica en HSCs humanas.

55 Los datos representados en las Figuras 7A a 7H muestran que el Comp. 1 incrementa la transferencia génica en células repobladoras a largo plazo linfomieloideas verdaderas (HSC). Usando una aproximación de trasplante

competitivo, se analizaron las células transducidas con o sin Comp. 1 en función de la repoblación *in vivo* directamente en el mismo receptor, lo que proporcionó una potencia incomparable para resolver las diferencias. La magnitud del incremento con Comp. 1 fue ~9 veces o incluso más que el evidente a partir del análisis *in vitro* de las subpoblaciones hematopoyéticas. Esto se puede deber a un impacto incluso mayor del Comp. 1 sobre la transferencia génica en HSC verdaderas en comparación con las células más tardías, y un posible incremento sobre el rendimiento de HSC incluso con el periodo de cultivo corto (22 hr).

Ejemplo 4: El Comp. 1 estimula el incremento de la transferencia génica en células de SCU CD34⁺ humanas (*in vitro*) y HSC humanas en ratones NSG.

Los resultados representados en las Figuras 8A a 8E y las Figuras 9A a 9D confirman el impacto significativo del Comp. 1 sobre la estimulación de la transferencia génica en HSC de sangre de cordón umbilical humano. Las Figuras 9A a 9D confirman el incremento de la transferencia génica en células de SCU analizado *in vitro*, y tras el trasplante mediante el uso de una fuente diferente de SCU y virus. Se observaron niveles totales equivalentes de quimerismo en los receptores del trasplante si las células se habían expuesto al Comp. 1 o si no se habían expuesto, y por tanto esto proporcionó pruebas de que el Comp. 1 no tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de HSC. Sin embargo, la determinación del quimerismo a partir de las células GFP marcadas confirmó un incremento significativo cuando las células se transdujeron en presencia del Comp. 1. Este incremento fue evidente a lo largo de un intervalo de dosis de trasplante. El incremento total en la transferencia génica en HSC tal como se estudió en este experimento fue de ~16 veces.

Ejemplo 5: La exposición a corto plazo al Comp. 1 durante solamente 2 horas incrementa la eficacia de la transferencia génica en las células hematopoyéticas humanas primitivas.

Las Figuras 10A a 10Q muestran que se observaron incrementos significativos en la transferencia génica en células CD34⁺ y subgrupos CD34⁺ con la exposición de las células durante solamente 2 hrs al comienzo (condición IV) o al final (condición V) del periodo de transducción. Se alcanzó una transferencia génica y un rendimiento máximo de células transducidas con la exposición durante 2 hrs al final del periodo de transducción, y fueron equivalentes a los alcanzados con la exposición durante el periodo completo de preestimulación (16 hrs, condición III). De manera importante, estos resultados se observaron con células CD34⁺ en bruto y subgrupos sumamente enriquecidos en HSC/progenitores (CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺). Además, los datos representados en las Figuras 11A y 11B muestran que se observó una transferencia génica y rendimientos incrementados en todas las condiciones de exposición al Comp. 1 sin preestimulación, lo que incluyó una exposición de solamente 2 horas durante las primeras 2 horas o últimas 2 horas del periodo de transducción.

Ejemplo 6: La capacidad del Comp. 1 de incrementar la transferencia génica se extiende a las células hematopoyéticas primitivas de médula ósea adulta y de sangre periférica movilizada adulta.

Los datos representados en las Figuras 12A y 12B proporcionan pruebas de que la capacidad del Comp. 1 de incrementar la transferencia génica incluye las células hematopoyéticas primitivas de médula ósea adulta y de sangre periférica movilizada adulta, además de las que se hallan en la sangre de cordón umbilical.

Ejemplo 7: La exposición al Comp. 1 incrementa la eficacia de la transferencia génica en células de SCU CD34⁺ mediante el uso de vectores lentivirales con diferentes envolturas, un lentivirus sin integración, y en diferentes condiciones.

El Comp. 1 incrementó la transferencia génica mediante el uso de lentivirus seudotipados (que portaban una envoltura) con VSV-G y RD114 (Figuras 13A y 13B), lo que sugiere por tanto que el Comp. 1 puede incrementar la transferencia génica en un intervalo más amplio de virus seudotipados. La Figura 13D muestra además que el Comp. 1 incrementa la eficacia de la transferencia génica transitoria de lentivirus que se generan mediante el uso de una integrasa inactiva catalíticamente, y por lo tanto hace que el lentivirus no se integre (lentivirus defectuoso en integración, IDLV). Los resultados de las Figuras 14 y 14B demuestran que la capacidad del Comp. 1 de estimular la transferencia génica en células hematopoyéticas humanas primitivas no se limita a un cóctel específico de factores de crecimiento, sino que se da en células cultivadas en presencia de diferentes combinaciones de factores de crecimiento. Además, los datos representados en las Figuras 15A a 15D demuestran que la capacidad del Comp. 1 de estimular la transferencia génica en células hematopoyéticas humanas primitivas se amplía a múltiples vectores lentivirales, y por tanto no se limita a un único vector.

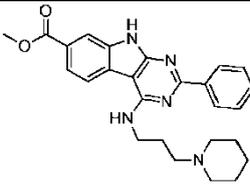
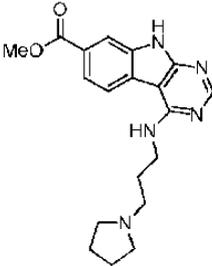
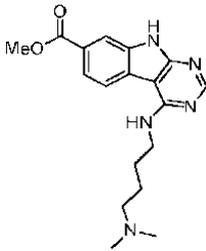
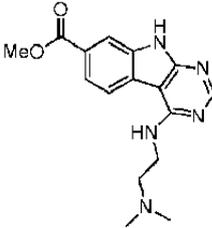
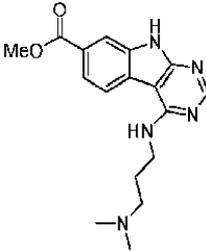
Ejemplo 8: La transferencia génica incrementada en células hematopoyéticas humanas primitivas se correlaciona con variantes del Comp. 1 que son activas para la estimulación de la expansión.

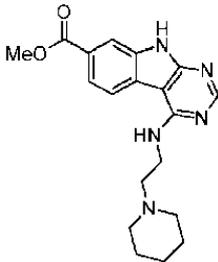
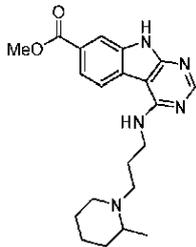
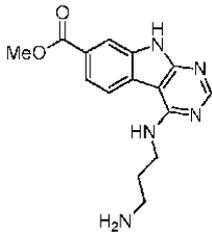
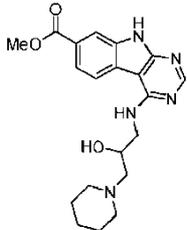
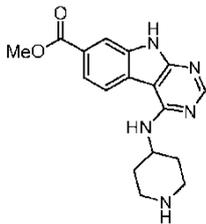
Las Figuras 16A y 16B muestran que el Comp. 1 y otras variantes del Comp. 1 que se sabe que son activas para la expansión de células CD34⁺ humanas (Comp. 3 a 6) incrementan la eficacia de la transferencia génica en las células de SCU CD34⁺ humanas y diferentes subgrupos CD34⁺. Además, este efecto de incremento no se observó con menos variantes activas del Comp. 1 (Comp. 7 y 8).

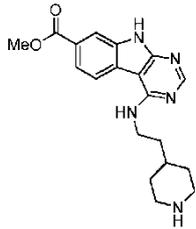
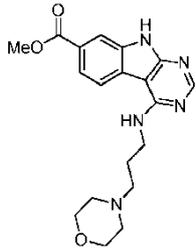
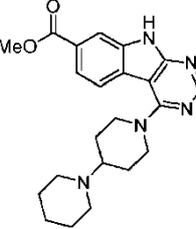
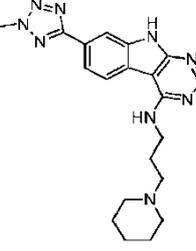
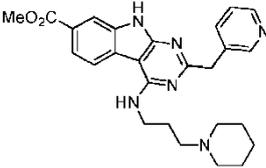
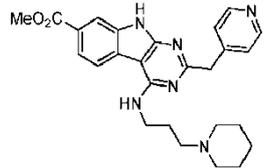
Las siguientes tablas ilustran los compuestos y su eficacia en la expansión de células CD34⁺ humanas. Algunos de estos compuestos se han ilustrado en los documentos WO 2013/110198 y PCT/CA2015/050330.

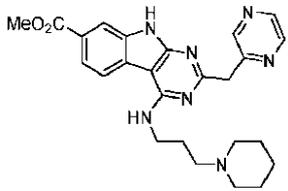
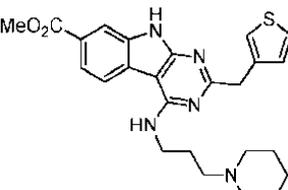
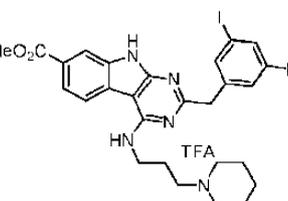
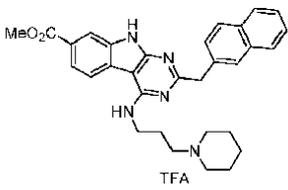
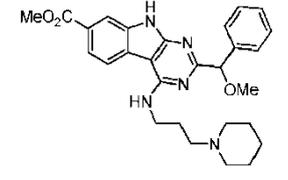
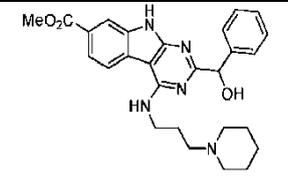
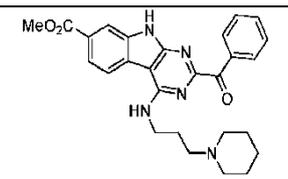
Tabla 1. Estructura, tiempo de retención en HPLC analítica, datos de LCMS y datos biológicos de los Ejemplos.

Número de Comp.	Estructura	T _R (min) de HPLC analítica	MS m/z (M+H) ⁺	Datos biológicos (CE ₅₀) [*]
1		1,72	454,2	E
2		1,38	368,2	C
3		1,74	472,2717	E
4		2,112	476,2499	E
5		1,57	656,3529	C
6		2,02	475,2155	C
7		1,67	396,2	A

8		1,82	444,2435	inactivo
9		1,35	354,2	D
10		1,55	342,2	C
11		1,30	314,2	D
12		1,29	328,2	B

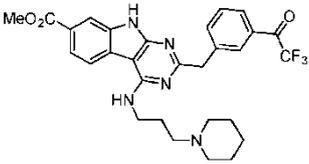
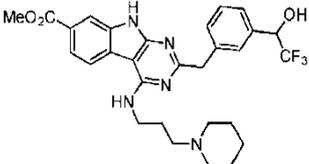
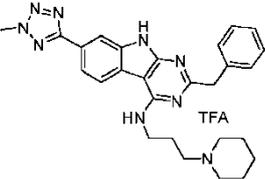
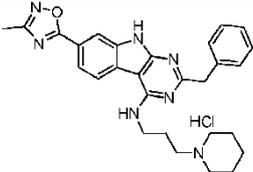
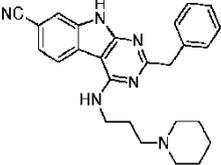
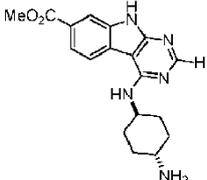
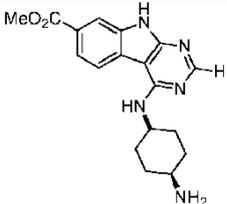
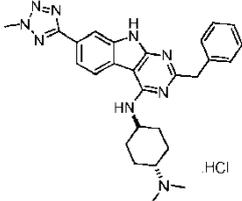
13		1,41	354,2	C
14		1,43	382,2	D
15		1,34	300,2	C
16		1,35	384,2	C
17		1,34	326,2	B

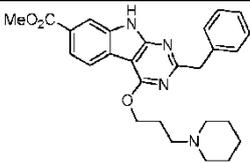
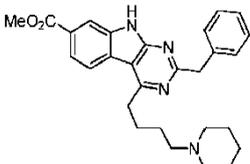
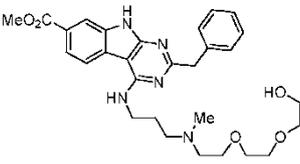
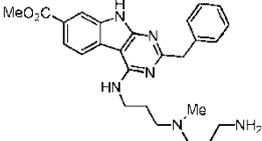
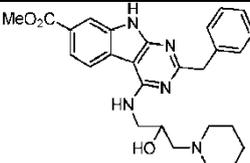
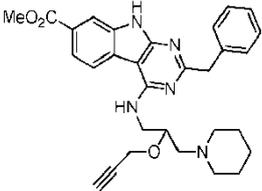
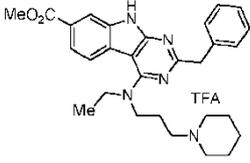
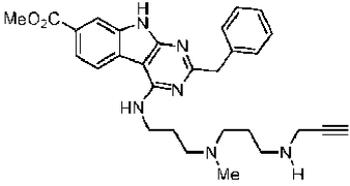
18		1,40	354,2	C
19		1,29	370,2	A
20		1,45	394,2	D
21		1,44	392,2	D
22		1,43	459,2	E
23		1,78	459,2518	C

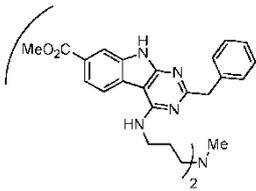
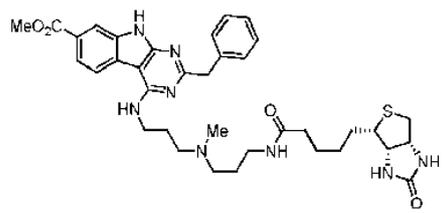
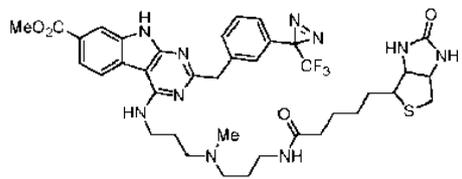
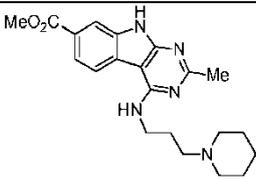
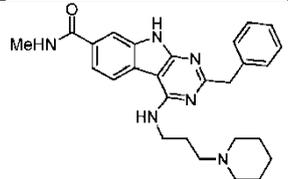
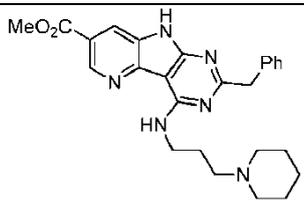
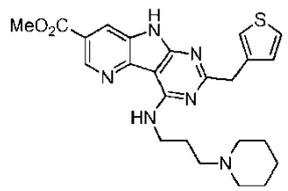
24		1,54	460,2	B
25		2,068	464,2145	E
26		2,349	662,063	E
27		2,206	508,2707	D
28		1,78	488,2665	E
29		1,68	474,2511	F
30		2,129	472,2342	F

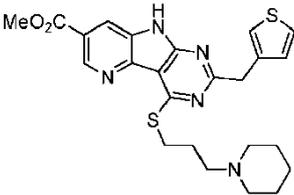
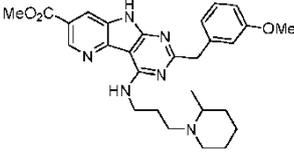
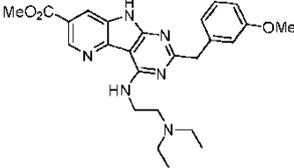
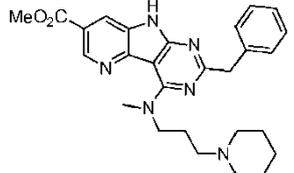
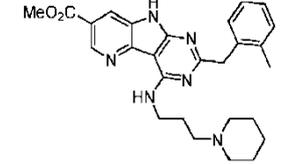
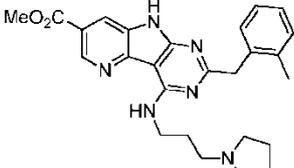
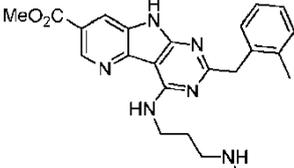
31		2,083	472,2724	E
32		2,05	566,2497	E
33		2,152	472,2733	F
34		2,052	458,2598	E
35		2,194	538,1670	E
36		2,142	472,2756	E
37		2,142	472,2740	E
38		2,070	488,2690	E

ES 2 773 892 T3

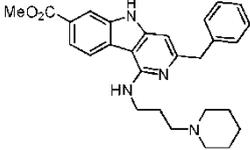
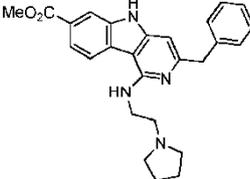
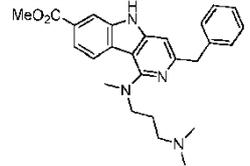
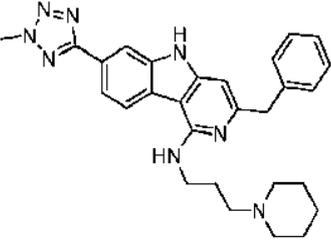
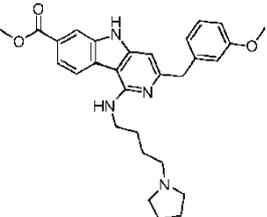
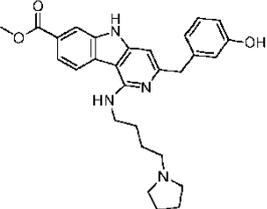
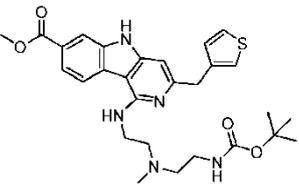
39		1,76-1,87 (hidratos)	554,2384	E
40		2,142	554,2	E
41		2,063	482,28	E
42		1,79	482,2663	F
43		1,68	425,2448	C
44		1,44	340,2	D
45		1,38	340,2	C
46		1,71	482,2785	E

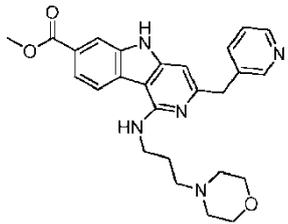
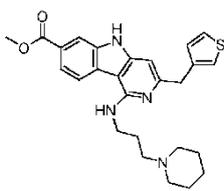
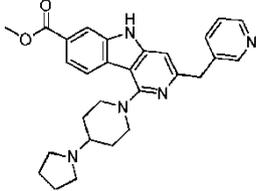
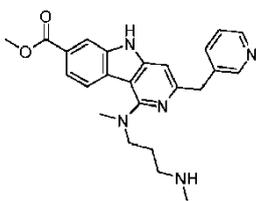
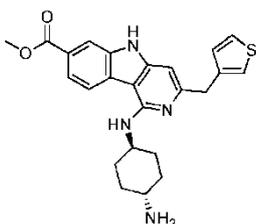
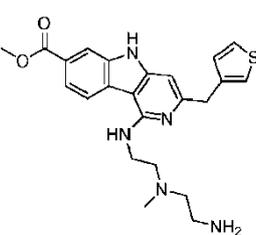
47		1,92	459,2392	B
48		1,75	457,2598	F
49		2,035	536,2867	E
50		1,63	461,2	E
51		1,70	474,2476	E
52		1,85	512,2632	E
53		2,161	586,2839	A
54		1,65	499,2823	F

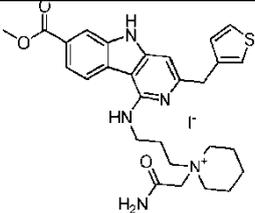
55		2,01	776,3	E
56		1,70	687,3	C
57		2,06	795,3368	F
58		1,46	382,2	A
59		1,53	457,2708	A
60		1,74	459,2	C
61		1,71	465,2	C

62		1,82	482,2	B
63		1,81	503,3	C
64		1,77	463,2	B
65		1,78	473,3	E
66		1,82	473,4	C
67		1,78	459,3	C
68		1,81	419,3	B

69		1,78	455,3	C
70		1,83	477,3	A
71		1,64	480,2	C
72		1,78	423,2	A
73		1,77	433,3	B
74		1,76	445,3	D
75		1,89	461,3	C
76		1,50	367,2	A

77		1,64	457,2	E
78		1,62	429,2	E
79		1,63	431,2	E
80		1,63	481,4	D
81		1,67	487,3	E
82		1,76	473,3	E
83		1,72	538,2	A

84		1,12	460,3	B
85		1,58	463,2	D
86		1,22	470,2	A
87		1,18	418,2	A
88		1,64	435,1	D
89		1,56	438,2	C

90		1,90	473,2	E
----	---	------	-------	---

La CE₅₀ se define como la concentración que da como resultado un incremento del 50% del recuento de células CD34⁺CD45RA⁻ en comparación con los cultivos con vehículo (DMSO). *CE₅₀: A >1000 nM; B = 500-1000 nM; C = 250-500 nM; D = 100-250; E = <100 nM; F = el compuesto mostró una expansión en una proporción > 1,3.

Ejemplo 9: El Comp. 1 incrementa la transducción y la expansión de células CD34⁺ y similares a LT-HSC modificadas genéticamente de médula ósea de macaco.

5 Las Figuras 17A a 17C muestran que la proporción de células CD45⁺ de primate en la sangre de ratones sometidos a trasplante se incrementa después del trasplante en presencia del Comp. 1, un efecto que no se obtiene con SR1. Las Figuras 18A a 18G y 19A a 19E muestran que hay un porcentaje incrementado de células de mono marcadas después de la transducción en presencia del Comp. 1; un rendimiento incrementado de células CD34⁺ transducidas cuando las células se infectaron y después se cultivaron durante 7 días en presencia del Comp. 1; y proporciones incrementadas de células marcadas en monos trasplantados con células transducidas y expandidas *in vitro* en presencia del Comp. 1.

10 Ejemplo 10: El Comp. 1 coopera con Rapamicina para incrementar la eficacia de la transferencia génica lentiviral en las células hematopoyéticas humanas.

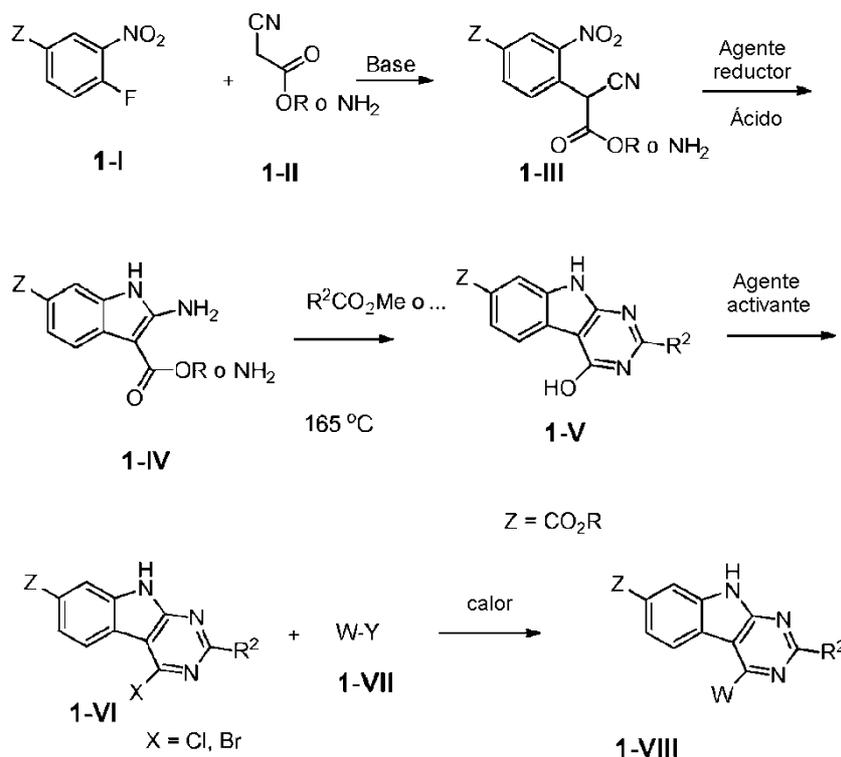
15 Las Figuras 20A a 20E muestran que el incremento de la transferencia génica lentiviral en las células CD34⁺ y subgrupos CD34⁺ es mayor en las células tratadas con una combinación de Comp. 1 y Rapamicina, respecto de las células tratadas con Comp. 1 solamente o Rapamicina solamente, lo que indica que estos dos compuestos cooperan para incrementar la eficacia de la transferencia génica lentiviral en las células hematopoyéticas humanas.

Ejemplo 11: Metodología sintética

20 La metodología sintética de los Compuestos 1 a 4 se presenta en el documento WO 2013/110198. Para los compuestos 5 a 8, se aplica la siguiente metodología sintética. La metodología sintética resumida más adelante se refiere a las realizaciones de la invención en las que el sustituyente Z está en la posición 7 del núcleo de pirimido indol. Como entenderá una persona experta, se puede llevar a cabo una metodología sintética similar, con variaciones que son evidentes para dicha persona, para las realizaciones de la invención en las que el sustituyente Z está en una posición diferente, tal como, por ejemplo, en la posición 5, 8 o 6, especialmente en la posición 6.

25 El Esquema 1 describe la síntesis del precursor común (1-VI) para los compuestos de la presente invención. En la primera etapa se trata un fluoruro de arilo 1-I con un cianoacetato de alquilo 1-II en presencia de una base tal como hidruro sódico. El producto resultante 1-III se trata después con un agente reductor tal como polvo de zinc en ácido acético para proporcionar los amino indoles 1-IV, que se convierten en las pirimidinas 1-V tras el tratamiento con formamida y formiato de amonio. Los Compuestos 1-V se tratan con reactivos tales como cloruro de fosforilo o bromuro de fosforilo para proporcionar los intermedios reactivos 1-VI, que se tratan con aminas 1-VII para proporcionar los compuestos 1-VIII de la presente invención.

Esquema 1



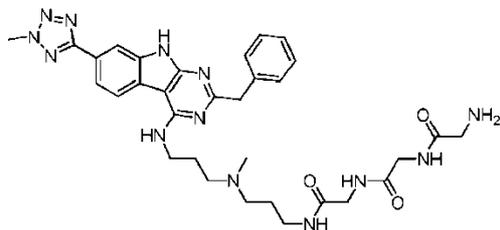
Ejemplos

General

5 El tiempo de retención de HPLC informado es para la HPLC de fase inversa (Agilent, serie 1200) mediante el uso de 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 0 al 100% de B en 2,0 minutos; columna: Zorbax C18, 3,5 micras, 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 modelo Quadrupole LC/MS G6120B de Agilent Technologies mediante el uso de 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 al 100% de B en 2,0 minutos; caudal: 0,3 mL / min; columna: Zorbax C18, 3,5 micras, 2,1 x 30 mm: longitud de onda 220 nm.

Compuesto 5



15 Una mezcla de 4-fluorobenzonitrilo (5 g, 41,3 mmol), óxido de dibutilestaño (2,055 g, 8,26 mmol), y trimetilsilil azida (8,22 mL, 61,9 mmol) en tolueno (165 mL) se calentó a 100 °C y se agitó durante 16,5 horas. Después de 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 anh., se filtraron y se concentraron hasta sequedad para proporcionar el Intermedio 1A, (5-(4-fluorofenil)-2H-tetrazol, 6,61 g, rendimiento del 98%) en forma de un sólido blanco; ¹H RMN (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%, TR = 1,96 minutos.

20 Una mezcla del Intermedio 1A (6,61 g, 40,3 mmol), K₂CO₃ (6,68 g, 48,3 mmol), y yodometano (3,02 mL, 48,3 mmol) en acetonitrilo (115 mL) se calentó a reflujo (aprox. 82 °C) durante una hora. Después de enfriar, la mezcla se concentró hasta sequedad y el residuo se repartió entre agua (75 mL) y EtOAc (100 mL). Las capas se separaron, la

capa acuosa se volvió a extraer 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 anh., se filtró y se concentró para proporcionar 9,5 g en forma de un aceite incoloro que solidificó en reposo. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar 2 productos principales: Intermedio 1B (isómero N2): 5-(4-fluorofenil)-2-metil-2H-tetrazol (5,09 g, rendimiento del 70,9%) en forma de un sólido blanco: No se observó un NOE entre el grupo metilo a 4,42 ppm y los protones aromáticos; ¹H RMN (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%, TR = 1,75 minutos.

El isómero N1: 5-(4-fluorofenil)-1-metil-1H-tetrazol (1,87 g, rendimiento del 26,1%) en forma de 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 RMN (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%, TR = 1,29 minutos.

Una disolución del Intermedio 1B (1 g, 5,61 mmol) en ácido sulfúrico (16,45 mL, 309 mmol) se enfrió a 0 °C y después se añadió gota a gota ácido nítrico fumante (0,288 mL, 6,17 mmol). Después de 2,5 horas, se añadió más ácido nítrico fumante (0,065 mL, 1,403 mmol) y la mezcla se dejó calentar a 20 °C. Después de 5 horas, la mezcla se vertió en una mezcla 2:1 de hielo-agua (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 a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar 5-(4-fluoro-3-nitrofenil)-2-metil-2H-tetrazol (1,16 g, rendimiento del 93%) en forma de un sólido blanquecino; ¹H RMN (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%, TR = 1,72 minutos.

A una suspensión fría (0 °C) de hidruro sódico al 60 %p en aceite mineral (0,443 g, 11,08 mmol) en DMF (5,67 mL) se le añadió una disolución de 2-cianoacetamida (0,888 g, 10,56 mmol) en DMF (2,268 mL) (Nota: Formación 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 mmol) en DMF (2,3 mL) para proporcionar una disolución de color púrpura intenso. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se vertió lentamente en una mezcla hielo - agua (33,0 mL) y HCl conc. (0,952 mL). La suspensión espesa amarilla resultante 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 a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar el Intermedio 1C (2-ciano-2-(4-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-2-nitrofenil)acetamida) (1,41 g, rendimiento del 95%) en forma de un sólido amarillo; ¹H RMN (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% a 220 nm, TR = 1,31 minutos.

Se añadió cloruro férrico hexahidrato (2,82 g, 10,44 mmol) y zinc (2,276 g, 34,8 mmol) por partes a una mezcla de 2-ciano-2-(4-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-2-nitrofenil)acetamida (1 g, 3,48 mmol) en DMF (8,71 mL) y agua (8,71 mL) para proporcionar una suspensión amarilla 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 hasta aprox. 20 mL (para eliminar la mayoría del MeOH). Después la mezcla se diluyó con agua (50 mL) y EtOAc (100 mL), se agitó enérgicamente 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 anh., se filtró y se concentró para proporcionar 489 mg en forma de un sólido púrpura que se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar el Intermedio 1D (2-amino-6-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-1H-indol-3-carboxamida) (356 mg, rendimiento del 39,7%) en forma de un sólido púrpura; ¹H RMN (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%, TR = 1,34 minutos.

Una mezcla del Intermedio 1D (2-amino-6-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-1H-indol-3-carboxamida, 0,35 g, 1,361 mmol), 2-fenilacetato de metilo (0,288 mL, 2,041 mmol) y metóxido sódico al 25 %p en MeOH (0,467 mL) en metanol (3,03 mL) se calentó en un horno de microondas a 140 °C durante una hora. Después de 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) y se secó a 40 °C a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar 2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-ol (220 mg, rendimiento del 45,2%) en forma de un sólido marrón; ¹H RMN (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%, TR = 1,89 minutos.

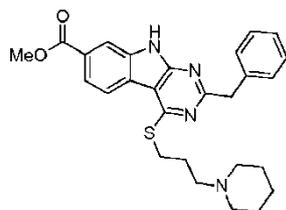
En un vial de microondas de 2-5 mL se añadió el producto bruto de 2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-ol (0,220 g, 0,616 mmol) y POCl₃ (3,90 mL, 41,9 mmol) para proporcionar una suspensión marrón. El vial se colocó en el horno de microondas y se calentó a 175 °C durante 15 minutos, y 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 la adición lenta de NaOH 50 %p (11 mL) y después EtOAc (80 mL). Se filtraron algunos sólidos y se separaron las capas. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (80 mL) y la capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anh., se filtró y se concentró hasta sequedad para proporcionar el derivado de cloro correspondiente: 2-bencil-4-cloro-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol (189 mg, rendimiento del 82%) en forma de un sólido marrón; ¹H RMN (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%, TR = 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 describió anteriormente (0,865 g, 2,302 mmol) y 3,3'-diamino-N-metildipropilamina (2,60 mL, 16,11 mmol) en MeOH (17,4 mL) se calentó 30 minutos a 140 °C en un horno de microondas. Tras el enfriamiento y la evaporación del disolvente, el residuo se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar N1-(3-aminopropil)-N3-(2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)-N1-metilpropano-1,3-diamina (832 mg, rendimiento del 74%) en forma de un sólido amarillo; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,52 (quin, *J*=6,85 Hz, 2 H) 1,80 (quin, *J*=6,85 Hz, 2 H) 2,18 (s, 3 H) 2,36 (t, *J*=7,24 Hz, 2 H) 2,41 (t, *J*=6,65 Hz, 2 H) 2,53 - 2,61 (m, 2 H) 3,64 (q, *J*=6,52 Hz, 2 H) 4,04 (s, 2 H) 4,43 (s, 3 H) 7,14 - 7,23 (m, 1 H) 7,28 (t, *J*=7,43 Hz, 2 H) 7,38 (d, *J*=7,43 Hz, 2 H) 7,49 (t, *J*=5,09 Hz, 1 H) 7,91 (d, *J*=8,22 Hz, 1 H) 8,08 (s, 1 H) 8,32 (d, *J*=8,22 Hz, 1 H); HPLC 99,4% a 254 nm, TR 1,608 minutos; HRMS *m/z* 485,2884 (M+H)⁺.

A una disolución de ácido 2,2-dimetil-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oico (0,224 g, 0,774 mmol) en DMF (3,00 mL) se le añadió HATU (0,294 g, 0,774 mmol) y DIPEA (0,270 ml, 1,548 mmol). La disolución se agitó durante 10 minutos, y después se añadió N1-(3-aminopropil)-N3-(2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)-N1-metilpropano-1,3-diamina (0,300 g, 0,619 mmol). Se agitó a 20 °C durante 3 horas. Se añadió ácido 2,2-dimetil-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oico (0,112 g, 0,387 mmol), HATU (0,147 g, 0,387 mmol) y DIPEA (0,135 ml, 0,774 mmol) y se agitó a 20 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se vertió en agua (30 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 mL) y después con salmuera (20 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anh., se filtró y se concentró para proporcionar 764 mg en forma de una espuma amarilla. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar (16-((2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)amino)-13-metil-2,5,8-trioxo-3,6,9,13-tetraazahexadecil)carbamato de terc-butilo (380 mg, rendimiento del 81%) en forma de un sólido amarillo; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,36 (s, 9 H) 1,52 - 1,65 (m, 2 H) 1,73 - 1,86 (m, 2 H) 2,18 (s, ancho, 3 H) 2,33 (s, ancho, 2 H) 2,41 (s, ancho, 2 H) 3,02 - 3,14 (m, 2 H) 3,57 (d, *J*=5,87 Hz, 2 H) 3,65 (m, *J*=5,50 Hz, 4 H) 3,72 (d, *J*=5,48 Hz, 2 H) 4,05 (s, 2 H) 4,43 (s, 3 H) 7,01 (t, *J*=5,48 Hz, 1 H) 7,15 - 7,22 (m, 1 H) 7,28 (t, *J*=7,63 Hz, 2 H) 7,37 (d, *J*=7,43 Hz, 2 H) 7,43 (t, *J*=5,28 Hz, 1 H) 7,72 (s, ancho, 1 H) 7,91 (dd, *J*=8,22, 1,17 Hz, 1 H) 8,08 (s, 3 H) 8,33 (d, *J*=8,22 Hz, 1 H) 12,00 (s, 1 H); HPLC 98,1% a 254 nm, TR 1,74 minutos; MS *m/z* 756,4 (M+H)⁺.

A una disolución de (16-((2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)amino)-13-metil-2,5,8-trioxo-3,6,9,13-tetraazahexadecil)carbamato de terc-butilo (0,380 g, 0,503 mmol) en CH₂Cl₂ (8,00 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (2,000 ml, 26,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Se añadió tolueno (5 mL) y la mezcla se concentró hasta sequedad para proporcionar 580 mg en forma de una espuma amarilla. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar 2-amino-N-(2-((3-((2-bencil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)amino)propil)(metil)amino)propil)amino)-2-oxoetil)acetamida (340 mg, rendimiento del 100%) en forma de una espuma amarilla; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,63 (dt, *J*=14,28, 6,95 Hz, 2 H) 1,87 (dt, *J*=13,99, 6,90 Hz, 2 H) 2,33 (s, 3 H) 2,52 - 2,56 (m, 2 H) 2,61 (t, ancho, *J*=6,70, 6,70 Hz, 2 H) 3,05 - 3,14 (m, 2 H) 3,55 (s, 2 H) 3,60 - 3,71 (m, 4 H) 3,83 (d, *J*=5,48 Hz, 2 H) 4,05 (s, 2 H) 4,43 (s, 3 H) 7,15 - 7,23 (m, 1 H) 7,28 (t, *J*=7,43 Hz, 2 H) 7,38 (d, *J*=7,43 Hz, 2 H) 7,43 (t, *J*=5,48 Hz, 1 H) 7,87 (t, *J*=5,67 Hz, 1 H) 7,91 (dd, *J*=8,22, 1,17 Hz, 1 H) 8,08 (d, *J*=1,20 Hz, 1 H) 8,22 (t, *J*=5,67 Hz, 1 H) 8,35 (d, *J*=8,22 Hz, 1 H) 8,55 (t, *J*=5,48 Hz, 1 H) 12,02 (s, ancho, 1 H); HPLC 99,4% a 254 nm, TR 1,57 minutos; HRMS *m/z* 656,3529 (M+H)⁺.

Compuesto 6



A una suspensión de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina (0,500 g, 2,52 mmol) en THF (14,83 ml, 181 mmol) se le añadió triisopropilsilanotiol (1,092 ml, 5,05 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (0,093 g, 0,252 mmol). Se añadió por partes hidruro sódico del 60 %p en aceite mineral (0,252 g, 6,31 mmol). La suspensión blanca resultante se calentó a 50 °C y se agitó durante 18,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 20 °C y se diluyó con agua (15 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (4 x 15 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 15 mL) y después con salmuera (15 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anh., se filtró y se concentró para proporcionar 1,51 g en forma de un aceite naranja. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar el Intermedio 2A, 1-(3-((triisopropilsilil)tio)propil)piperidina (714 mg, rendimiento del 90%) en forma de un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,06 (d, *J*=7,0 Hz, 18 H) 1,14 - 1,29 (m, 3 H) 1,36 (m, *J*=5,1 Hz, 2 H) 1,46 (quin, *J*=5,4 Hz, 4 H) 1,65 (quin, *J*=7,0 Hz, 2 H) 2,29 (m, *J*=6,7 Hz, 6 H) 2,53 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H); MS *m/z* 316,2 (M+H)⁺; HPLC >95%, TR = 2,19 minutos.

Se añadió por partes NaH del 60 %p en aceite mineral (3,41 g, 85 mmol) a una disolución fría de 2-cianoacetamida (7,18 g, 85 mmol) 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 mmol) en DMF (15 mL). Después de 3 horas, se añadió una mezcla de hielo, agua y 12 mL de HCl (10%). El sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó a alto vacío.

para proporcionar 9,1 g de 4-(2-amino-1-ciano-2-oxoetil)-3-nitrobenzoato de metilo: $^1\text{H RMN}$ (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).

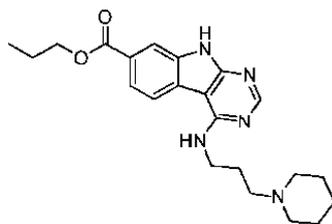
5 Se añadió cloruro férrico hexahidrato (1,540 g, 5,70 mmol) y zinc (1,242 g, 19,00 mmol) a una disolución de la cianoamida bruta preparada anteriormente (0,5 g, 1,900 mmol) en DMF (4,75 mL) y agua (4,75 mL) para proporcionar una suspensión amarilla. Tras el proceso exotérmico, la mezcla se calentó a 100 °C durante 45 minutos y después se enfrió lentamente a 20 °C y se 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 anh., se filtró y se concentró para proporcionar 287 mg en forma de un sólido marrón que se trató con acetona (6 mL) para proporcionar una suspensión sólida que se diluyó con hexano (5 mL). Después se recogió el sólido y se secó a 40 °C a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar el Intermedio 2C 2-amino-3-carbamoil-1H-indol-6-carboxilato de metilo (162 mg, rendimiento del 36,6%) en forma de un sólido blanquecino: $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3,80 (s, 3 H) 6,62 (s. ancho, 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%, TR = 1,37 minutos.

20 Se colocó una mezcla del Intermedio 2C (0,100 g, 0,429 mmol), 2-fenilacetato de metilo (0,302 mL, 2,14 mmol) y metóxido sódico del 30 %p en MeOH (0,402 mL, 2,14 mmol) en metanol (1,0 mL) en el horno de microondas y se calentó a 140 °C durante 30 minutos. Después de enfriar, se añadió AcOH (0,125 mL, 2,19 mmol) y la suspensión espesa resultante se agitó a 20 °C durante 1 hora. Los sólidos se filtraron, se lavaron con MeOH (3 x 0,5 mL) y se secaron a 20 °C a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar el Intermedio 2D (2-bencil-4-hidroxi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo) (91 mg, rendimiento del 63,7%) en forma de un sólido marrón; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3,87 (s, 3 H) 4,03 (s, 2 H) 7,22 - 7,29 (m, 1 H) 7,29 - 7,42 (m, 4 H) 7,83 (dd, $J=8,2$, 1,6 Hz, 1 H) 7,98 - 8,04 (m, 2 H) 12,46 (s. ancho 1 H) 12,50 (s. ancho, 1 H); MS m/z 334,2 (M+H) $^+$; HPLC 88,5% a 220 nm y 86,3% a 254 nm, TR = 1,96 minutos.

30 Una mezcla de 2-bencil-4-hidroxi-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,685 g, 2,05 mmol) en POCl_3 (12,64 mL, 136 mmol) se calentó a 90 °C durante 16 horas. Después de enfriar, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad. El sólido resultante se suspendió en NaHCO_3 sat. (50 mL) y EtOAc (75 mL). Se agitó enérgicamente durante 15 minutos, y después se filtró la mezcla. Las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 anh., se filtraron y se concentraron hasta sequedad para proporcionar 2-bencil-4-cloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (621 mg, rendimiento del 86%) en forma de un sólido marrón; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3,92 (s, 3 H) 4,31 (s, 2 H) 7,19 - 7,26 (m, 1 H) 7,28 - 7,39 (m, 4 H) 7,99 (dd, $J=8,2$, 1,2 Hz, 1 H) 8,14 (d, $J=1,2$ Hz, 1 H) 8,34 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 12,97 (s, 1 H); MS m/z 352,2 (M+H) $^+$; HPLC 92%, TR = 2,39 minutos.

35 A una disolución de 2-bencil-4-cloro-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,050 g, 0,142 mmol) y 1-(3-((trisisopropilsilil)tio)propil)piperidina (0,058 g, 0,185 mmol) en NMP (0,750 mL) se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio trihidrato (0,056 g, 0,178 mmol) y se agitó a 20 °C durante 6 horas. Se añadió más 1-(3-((trisisopropilsilil)tio)propil)piperidina (0,033 g, 0,104 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio trihidrato (0,029 g, 0,092 mmol), y se continuó agitando durante 4 días. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (25 mL). Se lavó con agua (3 x 7,5 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 anh., se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar el compuesto 6, 2-bencil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)tio)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (53 mg, rendimiento del 79%) en forma de un sólido marrón; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1,30 - 1,44 (m, 2 H) 1,51 (s. ancho, 4 H) 1,81 - 1,96 (m, 2 H) 2,17 - 2,47 (m, 6 H) 3,43 (t, $J=7,2$ Hz, 2 H) 3,90 (s, 3 H) 4,26 (s, 2 H) 7,17 - 7,25 (m, 1 H) 7,30 (t, $J=7,6$ Hz, 2 H) 7,34 - 7,41 (m, 2 H) 7,95 (dd, $J=8,2$, 1,6 Hz, 1 H) 8,07 - 8,14 (m, 2 H) 12,56 (s, 1 H); HPLC 95,1% a 254 nm, TR 2,02 minutos; HRMS m/z 475,2155 (M+H) $^+$.

Compuesto 7



50 Se añadió lentamente 2-cianoacetato de etilo (10,9 mL, 102 mmol) a una suspensión de hidruro sódico del 60 %p en aceite mineral (4,10 g, 102 mmol) en DMF (125 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 minutos y se añadió 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (10,2 g, 51 mmol) en DMF (125 mL). La mezcla de color rojo intenso resultante se agitó a 0 °C durante 30 minutos y después a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con HCl 1 N (40 mL) y EtOAc (40 mL). La capa acuosa separada se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar

un residuo (26 g) que se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar 4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-3-nitrobenzoato de metilo (14,9 g, rendimiento del 100%); ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,19 (t, *J*=7,0 Hz, 3 H) 3,93 (s, 3 H) 4,23 (q, *J*=7,0 Hz, 2 H) 6,38 (s, 1 H) 7,87 - 7,99 (m, 1 H) 8,42 (d, *J*=7,8 Hz, 1 H) 8,64 (s. ancho, 1 H); LCMS *m/z* 291,0 (M - H)⁻, HPLC >95%, TR 1,76 minutos.

5 A una disolución de 4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-3-nitrobenzoato de metilo (14,9 g, 51,0 mmol) en ácido acético (255 mL) se le añadió polvo de zinc (16,7 g, 255 mmol) en porciones a lo largo de 35 minutos. La mezcla se calentó a 100 °C durante 15 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró a través de Celite y se lavó con acetato de etilo. La evaporación del disolvente proporcionó un residuo que se trituró en una mezcla de diclorometano y hexanos. Los sólidos se filtraron, se lavaron con hexanos (3 x 15 mL) y se secaron a 20 °C a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar el Intermedio 3A (2-amino-1*H*-indol-3,6-dicarboxilato de 3-etilo 6-metilo) (6,3 g, rendimiento del 47,1%) en forma de un sólido púrpura; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,32 (t, *J*=7,0 Hz, 3 H) 3,81 (s, 3 H) 4,24 (q, *J*=7,0 Hz, 2 H) 6,99 (s, 2 H) 7,55 - 7,64 (m, 2 H) 7,74 (s, 1 H) 10,84 (s, 1 H); LCMS *m/z* 263,2 (M + H)⁺, HPLC 70%, TR 1,90 minutos.

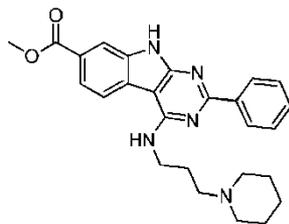
15 Una suspensión de 2-amino-1*H*-indol-3,6-dicarboxilato de 3-etilo 6-metilo (1,1 g, 4,19 mmol), formiato de amonio (0,53 g, 8,39 mmol) en formamida (16,7 mL, 419 mmol) se calentó a 165 °C durante 12 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió agua. El precipitado resultante se filtró, se secó al aire y se secó a alto vacío para proporcionar 4-hidroxi-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-carboxilato de metilo (1,1 g, rendimiento del 108%) en forma de un sólido gris; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,89 (s, 3 H) 7,86 (dd, *J*=8,2, 1,6 Hz, 1 H) 8,05 - 8,08 (m, 2 H) 8,21 (d, *J*=3,9 Hz, 1 H) 12,36 (s. ancho, 1 H) 12,51 (s. ancho 1 H); LCMS *m/z* 244,2 (M + H)⁺; HPLC 71%, TR 1,51 minutos.

20 Una mezcla de 4-hidroxi-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-carboxilato de metilo (1,1 g, 4,5 mmol) y oxiclورو fosforoso (15 mL, 161 mmol) se calentó a 90 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida. El residuo se suspendió en CH₂Cl₂ (20 mL) y se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró hasta sequedad para proporcionar 4-cloro-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-carboxilato de metilo (360 mg, rendimiento del 30,4%) en forma de un sólido naranja; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,93 (s, 3 H) 8,02 (dd, *J*=8,20, 1,20 Hz, 1 H) 8,19 (s, 1 H) 8,40 (d, *J*=8,22 Hz, 1 H) 8,86 (s, 1 H) 13,07 (s, 1 H); LCMS *m/z* 262,0 (M+H)⁺, HPLC 71%, TR 2,02 minutos.

25 Una mezcla de 4-cloro-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-carboxilato de metilo (86 mg, 0,33 mmol), trietilamina (0,09 mL, 0,66 mmol) y 3-(piperidin-1-il)propan-1-amina (0,078 mL, 0,49 mmol) en metanol (2 mL) 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 bruto se purificó mediante cromatografía rápida para proporcionar el Intermedio 3B (4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-carboxilato de metilo) (40 mg, rendimiento del 33,1%) en forma de un sólido blanquecino; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,38 (m, *J*=4,70 Hz, 2 H) 1,49 (quin, *J*=5,48 Hz, 4 H) 1,82 (quin, *J*=7,04 Hz, 2 H) 2,21 - 2,45 (m, 6 H) 3,64 (q, *J*=6,52 Hz, 2 H) 3,89 (s, 3 H) 7,42 (t, *J*=5,67 Hz, 1 H) 7,84 (dd, *J*=8,20, 1,20 Hz, 1 H) 8,04 (d, *J*=1,20 Hz, 1 H) 8,38 (s, 1 H) 8,41 (d, *J*=8,22 Hz, 1 H) 12,15 (s. ancho, 1 H); LCMS *m/z* 368,2 (M+H)⁺, HPLC 96,8% a 254 nm; TR 1,38 minutos.

30 Una mezcla de 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-carboxilato de metilo (40 mg, 0,109 mmol) y H₂SO₄ (87 μL, 1,633 mmol) en propanol (1 mL) se calentó a 70 °C durante 3 días. Se concentró a aprox. 0,5 mL y se diluyó con EtOAc (10 mL) y agua (10 mL). Se neutralizó a pH 7-8 con K₂CO₃ sólido (aprox. 100 mg). Las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (10 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ anh., se filtraron y se concentraron hasta sequedad para proporcionar el compuesto 7, 4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-carboxilato de propilo (17 mg, rendimiento del 40%) en forma de un sólido blanco; ¹H RMN (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ ppm 8,36 (s, 1H), 8,24 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,97 (dd, *J* = 8,2, 1,2 Hz, 1H), 4,33 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,74 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,41 - 2,59 (m, 6H), 1,93 - 2,05 (m, 2H), 1,78 - 1,92 (m, 2H), 1,56 - 1,68 (m, 4H), 1,49 (s. ancho, 2H), 1,08 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H); HPLC >95% a 254 nm, TR 1,67 minutos; LCMS *m/z* 396,2 (M+H)⁺.

Compuesto 8



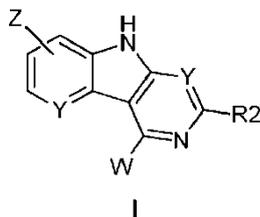
35 Una mezcla de Intermedio 2C (80 mg, 0,343 mmol) y benzaldehído (70 μL, 0,686 mmol) en ácido acético (1 mL) se calentó a 110 °C durante 22 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 20 °C y se diluyó con éter dietílico (10 mL). Los sólidos se filtraron, se lavaron con Et₂O (3 x 1 mL), se secaron a 20 °C a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar el Intermedio 4A, 4-hidroxi-2-fenil-9*H*-pirimido[4,5-*b*]indol-7-carboxilato de metilo (47 mg, rendimiento del 42,9%) en forma de un sólido marrón; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,89 (s, 3 H) 7,53 - 7,65 (m, 3 H) 7,87 (dd,

$J=8,22$, 1,56 Hz, 1 H) 8,06 - 8,12 (m, 2 H) 8,18 - 8,24 (m, 2 H) 12,55 (s. ancho, 2 H); LCMS m/z 320,2 (M+H)⁺.

- 5 Una mezcla de 4-hidroxi-2-fenil-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,050 g, 0,157 mmol) en POCl_3 (1 mL, 10,73 mmol) se calentó a 95 °C durante 16 horas. Después de enfriar, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad. Se suspendió el sólido resultante en NaHCO_3 sat. (10 mL) y se agitó durante 30 minutos. Los sólidos se filtraron, se lavaron con Et_2O (3 x 1 mL), se secaron a 20 °C a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar 4-cloro-2-fenil-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (40 mg, rendimiento del 75%) en forma de un sólido marrón; ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3,93 (s, 3 H) 7,51 - 7,64 (m, 3 H) 7,95 - 8,06 (m, 1 H) 8,13 - 8,20 (m, 1 H) 8,38 (d, $J=8,22$ Hz, 1 H) 8,42 - 8,51 (m, 2 H) 13,08 (s, 1 H); MS m/z 338,2 (M+H)⁺; HPLC 99,2% a 254 nm, TR = 2,48 minutos.
- 10 Una mezcla de 4-cloro-2-fenil-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (0,043 g, 0,127 mmol), trietilamina (35 μL , 0,255 mmol) y 3-(piperidin-1-il)propan-1-amina (32 μL , 0,191 mmol) en MeOH (0,6 ml) se calentó 25 minutos a 140 °C en un horno de microondas. Se enfrió a 20 °C y se concentró hasta sequedad.
- 15 La purificación en HPLC prep. proporcionó el compuesto 8, 2,2,2-trifluoroacetato de 2-fenil-4-((3-(piperidin-1-il)propil)amino)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo (32 mg, rendimiento del 45,0%) en forma de un sólido amarillo claro; ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,35 (s. ancho, 1 H) 1,51 - 1,70 (m, 3 H) 1,70 - 1,85 (m, 2 H) 2,08 - 2,28 (m, 2 H) 2,76 - 2,97 (m, 2 H) 3,33 - 3,50 (m, 2 H) 3,50 - 3,66 (m, 2 H) 3,79 - 3,98 (m, 5 H) 7,40 - 7,58 (m, 3 H) 7,63 (s. ancho, 1 H) 7,77 - 7,95 (m, 1 H) 8,06 (s. ancho, 1 H) 8,40 - 8,56 (m, 3 H) 8,89 - 9,24 (m, 1 H) 12,28 (s. ancho, 1 H); HPLC 99,9% a 254 nm, TR 1,82 minutos; HRMS m/z 444,2435 (M+H)⁺.
- 20 En las reivindicaciones, la frase "que comprende" se usa como una expresión indefinida, sustancialmente equivalente a la frase "que incluye". Las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen las referencias plurales correspondientes, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

REIVINDICACIONES

1. Un método para transducir un vector viral en células, y dicho método comprende poner en contacto dichas células *in vitro* con un compuesto de fórmula general I; y transducir dichas células con dicho vector viral,



5 o una sal o un profármaco del mismo,

en la que:

cada Y se selecciona independientemente de N y CH;

Z es

- 1) -CN
- 10 2) -C(O)OR₁,
- 3) -C(O)N(R₁)R₃,
- 4) -C(O)R₁, o
- 5) -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄,

15 en la que, cuando (R₁) y R₃ están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R₄;

W es

- 1) -CN,
- 2) -N(R₁)R₃,
- 20 3) -C(O)OR₁,
- 4) -C(O)N(R₁)R₃,
- 5) -NR₁C(O)R₁,
- 6) -NR₁C(O)OR₁,
- 7) -OC(O)N(R₁)R₃,
- 25 8) -OC(O)R₁,
- 9) -C(O)R₁,
- 10) -NR₁C(O)N(R₁)R₃,
- 11) -NR₁S(O)₂R₁,
- 12) -bencilo sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R₁,
- 30 13) -X-L-(X-L)_n - N(R₁)R₃,
- 14) -X-L-(X-L)_n - heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄ unidos en uno o los dos grupos L y heteroarilo,
- 15) -X-L-(X-L)_n - heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄ unidos en uno o los dos grupos L y heterociclilo,
- 35 16) -X-L-(X-L)_n- arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄,

17) -X-L-(X-L)_n-NR₁RA o

18) -(N(R₁)-L)_n - N⁺R₁R₃R₅ R₆⁻

en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, 3, 4, o 5,

5 y en la que, cuando R₁ y R₃ están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R₄;

cada X se selecciona independientemente de O, S, y NR₁;

cada L es independientemente

- 10
- 1) -alquileo C₁₋₆,
 - 2) -alquenileno C₂₋₆,
 - 3) -alquinileno C₂₋₆,
 - 4) -cicloalquileo C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S o
 - 5) -cicloalquenileno C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S

15 en la que los grupos alquileo, alquenileno, alquinileno, cicloalquileo y cicloalquenileno están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con uno o dos sustituyentes R₄ o RA;

R₁ es cada uno independientemente

- 20
- 1) -H,
 - 2) -alquilo C₁₋₆,
 - 3) -alquenilo C₂₋₆,
 - 4) -alquinilo C₂₋₆,
 - 5) -cicloalquilo C₃₋₇,
 - 6) -cicloalquenilo C₃₋₇,
 - 7) -C₁₋₅ perfluorado,
 - 8) -heterociclilo,
 - 25 9) -arilo,
 - 10) -heteroarilo, o
 - 11) -bencilo,

en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquenilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R_d;

30 R₂ es

- 1) -H,
- 2) -alquilo C₁₋₆, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA
- 3) -C(O)R₄,
- 4) -L-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄,
- 35 5) -L-heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R₄, o
- 6) -L-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R₄;

R₃ es cada uno independientemente

- 1) -H,

- 2) -alquilo C₁₋₆,
 3) -alqueno C₂₋₆,
 4) -alquino C₂₋₆,
 5) -cicloalquilo C₃₋₇,
 5 6) -cicloalqueno C₃₋₇,
 7) -C₁₋₅ perfluorado,
 8) -heterociclilo,
 9) -arilo,
 10) -heteroarilo, o
 10 11) -bencilo,

en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R4 es cada uno independientemente

- 15 1) -H,
 2) -alquilo C₁₋₆,
 3) -alqueno C₂₋₆,
 4) -alquino C₂₋₆,
 5) -cicloalquilo C₃₋₇,
 20 6) -cicloalqueno C₃₋₇,
 7) -C₁₋₅ perfluorado,
 8) -heterociclilo,
 9) -arilo,
 10) -heteroarilo, o
 25 11) -bencilo,

en la que los grupos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R5 es cada uno independientemente

- 30 1) -alquilo C₁₋₆,
 2) -alqueno C₁₋₆-alqueno C₂₋₆ que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S
 3) -alqueno C₁₋₆-alquino C₂₋₆ que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S
 35 4) -L-arilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4
 5) -L-heteroarilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4
 6) -alqueno C₁₋₆-C(O)O-
 7) -alqueno C₁₋₆-C(O)OR1
 8) -alqueno C₁₋₆-CN

9) -alquileo $C_{1-6}-C(O)NR_1R_3$, en el que R_1 y R_3 opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S; o

10) -alquileo $C_{1-6}-OH$;

5 R6 es

1) Halógeno

2) $OC(O)CF_3$ o

3) $OC(O)R_1$;

RA es cada uno independientemente

10 1) -halógeno,

2) $-CF_3$,

3) $-OR_1$,

4) $-L-OR_1$,

5) $-OCF_3$,

15 6) $-SR_1$,

7) $-CN$,

8) $-NO_2$,

9) $-NR_1R_3$,

10) $-L-NR_1R_1$,

20 11) $-C(O)OR_1$,

12) $S(O)_2R_4$

13) $-C(O)N(R_1)R_3$,

14) $-NR_1C(O)R_1$,

15) $-NR_1C(O)OR_1$,

25 16) $-OC(O)N(R_1)R_3$,

17) $-OC(O)R_1$,

18) $-C(O)R_4$,

19) $-NHC(O)N(R_1)R_3$,

20) $-NR_1C(O)N(R_1)R_3$, o

30 21) $-N_3$; y

Rd es cada uno independientemente

1) $-H$,

2) -alquilo C_{1-6} ,

3) -alqueno C_{2-6} ,

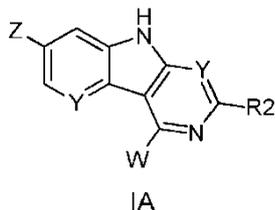
35 4) -alquino C_{2-6} ,

5) -cicloalquilo C_{3-7} ,

6) -cicloalqueno C_{3-7} ,

- 7) -C₁₋₅ perfluorado
 8) -bencilo o
 9) -heterociclilo.

2. El método según la reivindicación 1, en el que el compuesto es de fórmula IA



5

o una sal o un profármaco del mismo,

en la que W, Y, Z y R2 son cada uno como se definieron en la reivindicación 1.

3. El método según la reivindicación 2, en el que

cada Y se selecciona independientemente de N y CH;

10 Z es -CN, -C(O)OR1, -C(O)N(R1)R3, o -heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

W es -CN, -N(R1)R3, -bencilo sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o R1, -X-L-(X-L)_n - N(R1)R3, -X-L-(X-L)_n-NR1RA o -(N(R1)-L)_n - N⁺R1R3R5 R6⁻

en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3

15 y en la que, cuando R1 y R3 están unidos a un átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3 a 7 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

cada X es independientemente O, S, o NR1,

20 L es cada uno independientemente -alquileo C₁₋₆, -alquenileno C₂₋₆, -alquinileno C₂₋₆, -cicloalquileno C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S o -cicloalquenileno C₃₋₇, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S,

en la que el alquileo, el alquenileno, el alquinileno el cicloalquileno y el cicloalquenileno están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con uno o dos sustituyentes R4 o RA;

R1 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalquenilo C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -heteroarilo, o -bencilo,

25 en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R2 es -H, -alquilo C₁₋₆, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA, -C(O)R4, -L-heteroarilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4, -L-heterociclilo sustituido opcionalmente con uno o más RA o R4, o -L-arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4;

30

R3 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, o -C₁₋₅ perfluorado,

en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo perfluorado están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R4 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalquenilo C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -heterociclilo, -arilo, -heteroarilo, o -bencilo,

35

en la que los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo perfluorado, heterociclilo, arilo, heteroarilo y bencilo están opcionalmente sustituidos cada uno independientemente con 1, 2 o 3 sustituyentes RA o Rd;

R5 es cada uno independientemente -alquilo C₁₋₆, -L-arilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4, -L-heteroarilo que incluye opcionalmente uno o más sustituyentes RA o R4, -alquileno C₁₋₆-C(O)O-, -alquileno C₁₋₆-C(O)OR1, -alquileno C₁₋₆-CN, -alquileno C₁₋₆-C(O)NR1R3, o -alquileno C₁₋₆-OH;

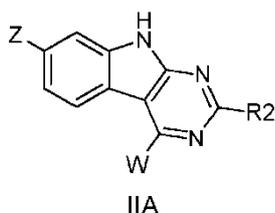
40

R6 es halógeno, -OC(O)CF₃ o OC(O)R1;

RA es cada uno independientemente -halógeno, -CF₃, -OR1, -L-OR1, -OCF₃, -SR1, -CN, -NO₂, -NR1R3, -L-NR1R1, -C(O)OR1, S(O)₂R4, -C(O)N(R1)R3, -NR1C(O)R1, -NR1C(O)OR1, -OC(O)N(R1)R3, -OC(O)R1, -C(O)R4, -NHC(O)N(R1)R3, -NR1C(O)N(R1)R3, o -N₃;

5 Rd es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, -cicloalquenilo C₃₋₇, -C₁₋₅ perfluorado, -bencilo o -heterociclilo.

4. El método según la reivindicación 1, en el que el compuesto es de fórmula IIA:



o una sal o un profármaco del mismo,

10 en la que Z, W y R2 son cada uno como se definieron en la reivindicación 1.

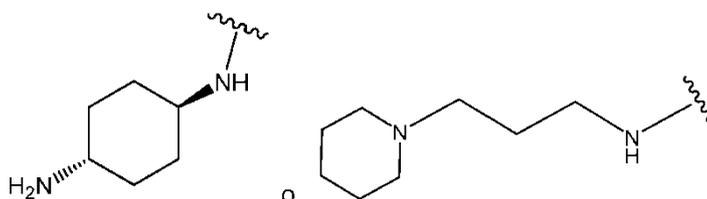
5. El método según la reivindicación 4, en el que:

Z es CO₂Me o 2-metil-2H-tetrazol-5-ilo;

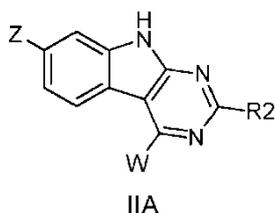
R2 es bencilo, o H; y

15 W es NH-L-N(R1)R3 en la que L es alquilenilo C₂₋₄ o cicloalquilenilo C₃₋₇ y R1 y R3 es alquilo C₁₋₄ o H; o R1 y R3 están unidos junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 3 a 7 miembros, que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N, O y S, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4.

6. El método según la reivindicación 5, en el que W es



20 7. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto es de fórmula IIA



o una sal del mismo,

en la que

25 Z es -C(O)O-alquilo C₁₋₄, o -heteroarilo, preferiblemente un anillo heteroarilo de 5 miembros que comprende 2-4 heteroátomos seleccionados de N y O, sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes RA o R4,

30 W es -N(R1)R3, -NR1-alquilenilo C₁₋₆-N(R1)R3, -O-alquilenilo C₁₋₆-N(R1)R3, -S-alquilenilo C₁₋₆-N(R1)R3, o -NR1-alquilenilo C₁₋₆-(NR1-alquilenilo C₁₋₆)_n-NR1R3, en la que n es un número entero igual a 0, 1, 2, o 3 y en la que, cuando R1 y R3 están unidos al mismo átomo de nitrógeno, opcionalmente están unidos junto con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5 a 6 miembros que incluye opcionalmente otro u otros heteroátomos seleccionados de N y O, y opcionalmente el anillo está sustituido con uno o más RA o R4;

R1 es cada uno independientemente -H, -alquilo C₁₋₆, -cicloalquilo C₃₋₇, o -heterociclilo,

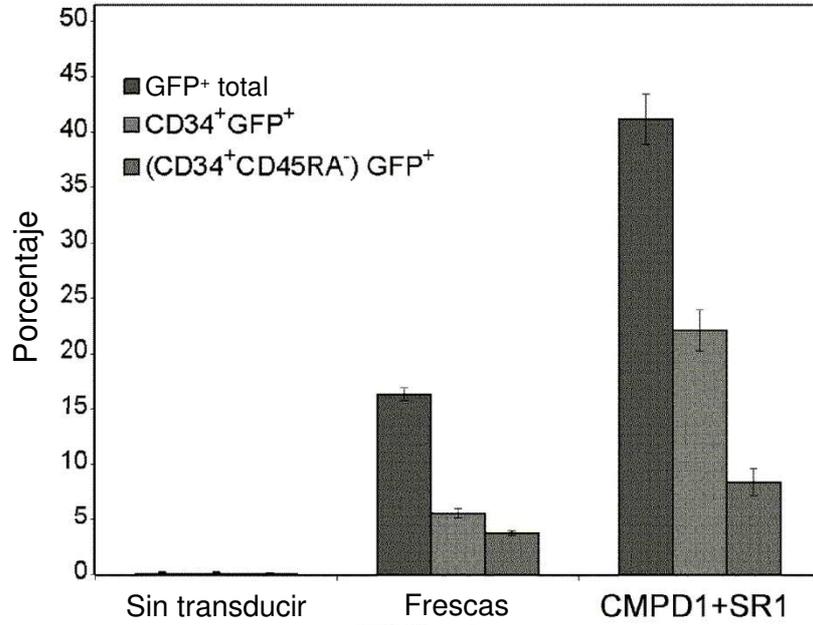


FIG. 1

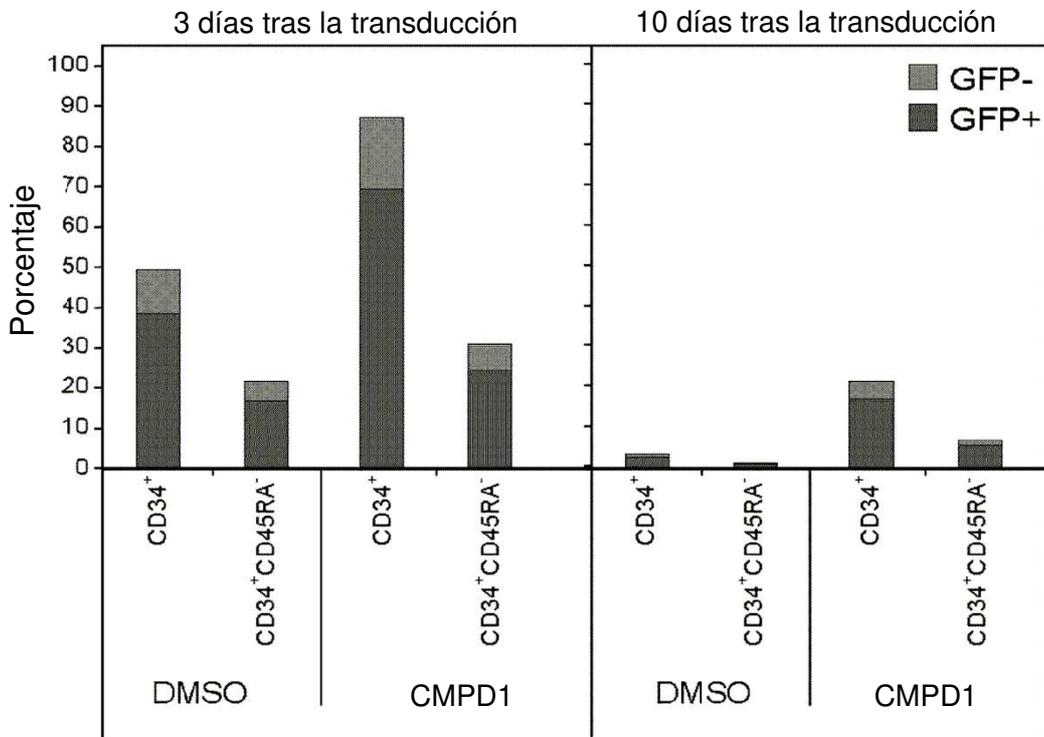


FIG. 2

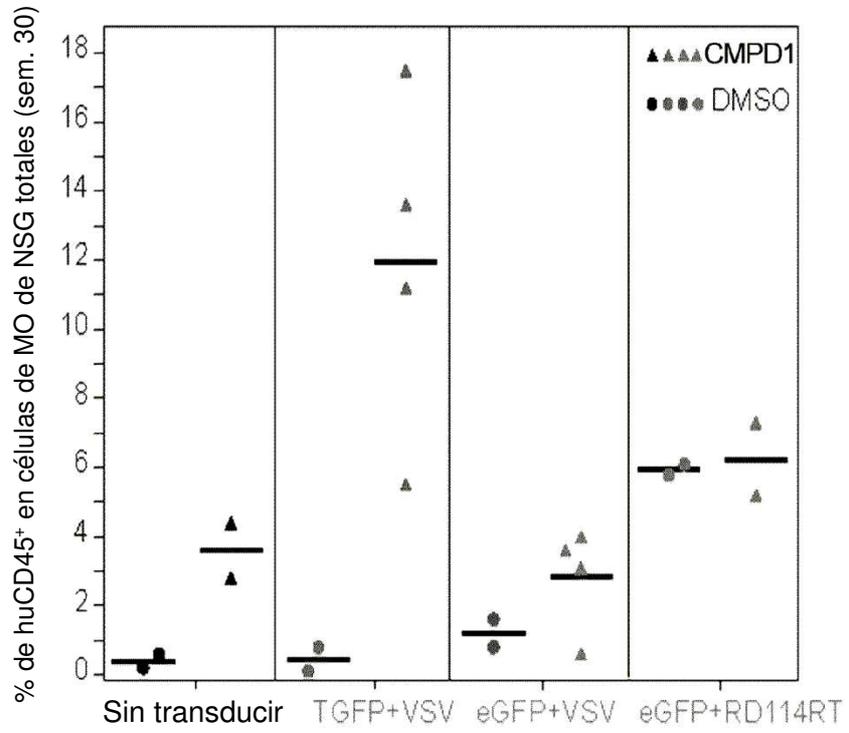


FIG. 3A

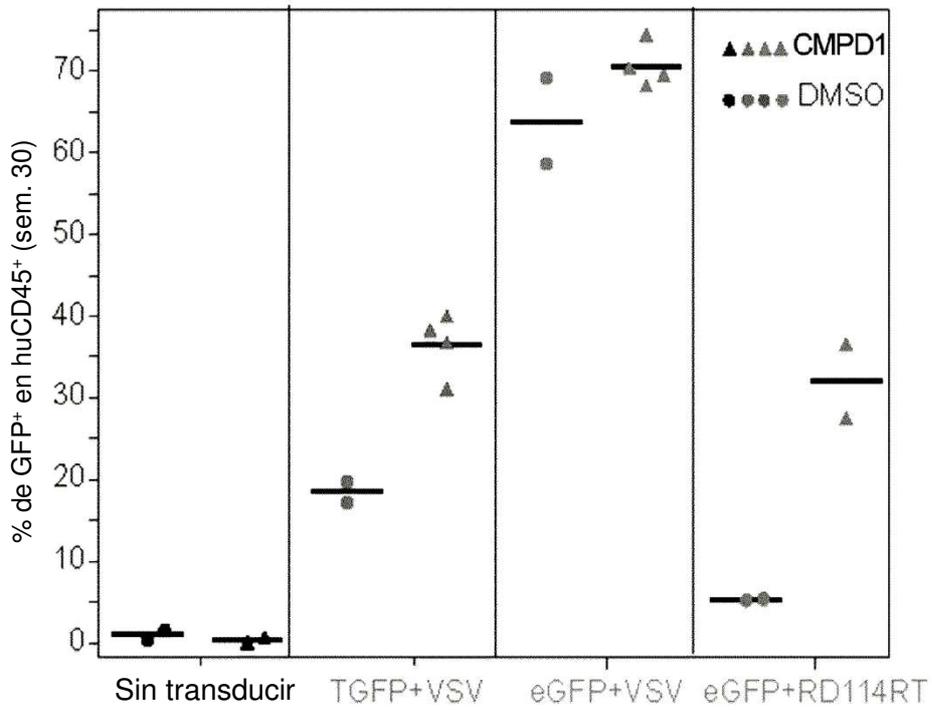


FIG. 3B

Etiqueta de ratón n°	Transducción + condición de cultivo	Envoltura del lentivirus	MOI	% de huCD45+ de las células de médula ósea de NSG totales (considerado positivo para % ≤ 0.1)	% de huCD45+ GFP+ de las células de médula ósea de NSG totales	% de huCD45+ GFP- de las células de médula ósea de NSG totales
14406	DMSO	VSV	50	0.10	0.02	0.08
14407		VSV	100	0.80	0.14	0.66
14408		RDT114	50	5.80	0.30	5.50
14409		RDT114	100	6.10	0.33	5.77
14410		VSV	50	0.80	0.47	0.33
14411		VSV	100	1.60	1.11	0.49
14412		sin transducir	0	0.20	0.00	0.20
14413		sin transducir	0	0.60	0.00	0.59
14414		VSV	50	11.20	3.47	7.73
14415		VSV	50	13.60	4.99	8.61
14416		VSV	100	17.50	6.70	10.80
14417	CMPD1	VSV	100	5.50	2.20	3.30
14418		RDT114	50	7.30	2.66	4.64
14419		RDT114	100	5.20	1.43	3.77
14420		VSV	50	3.10	2.15	0.95
14421		VSV	50	4.00	2.98	1.02
14422		VSV	100	0.60	0.42	0.18
14423		VSV	100	3.60	2.46	1.14
14424		sin transducir	0	2.80	0.00	2.80
14425		sin transducir	0	4.40	0.00	4.40

FIG. 4

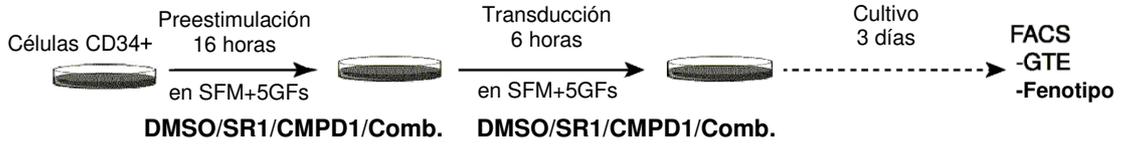


FIG. 5A

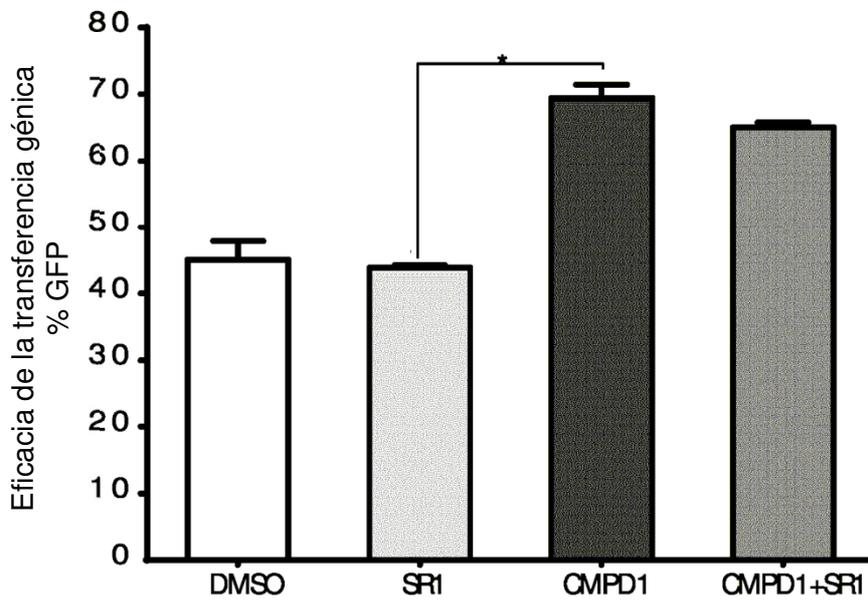


FIG. 5B

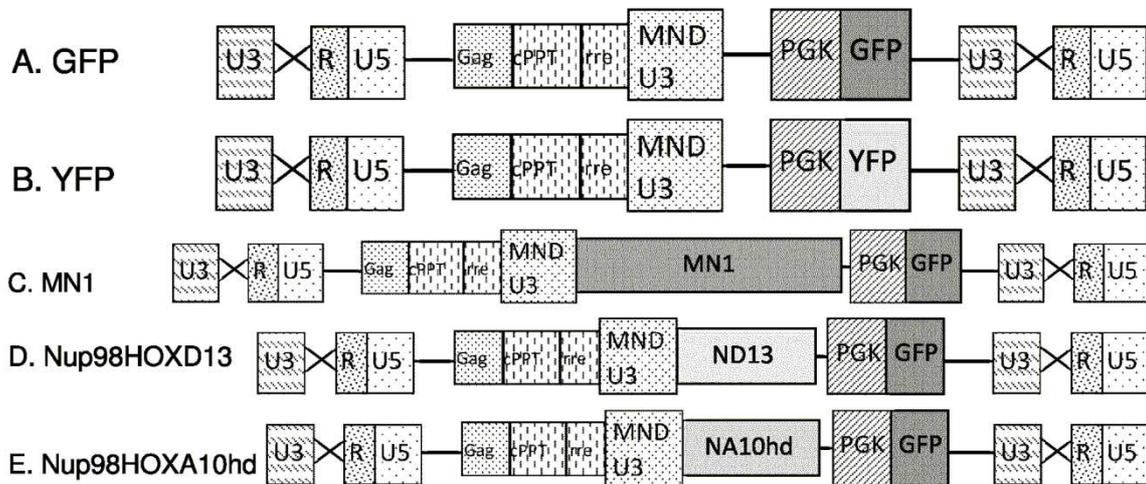


FIG. 5C

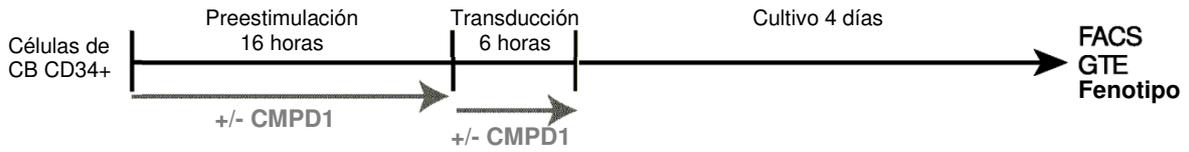


FIG. 6A

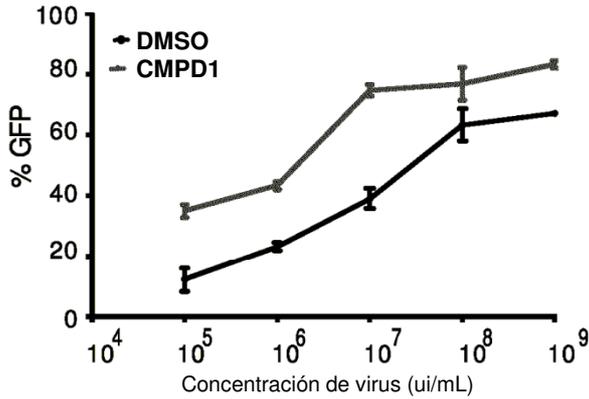


FIG. 6B

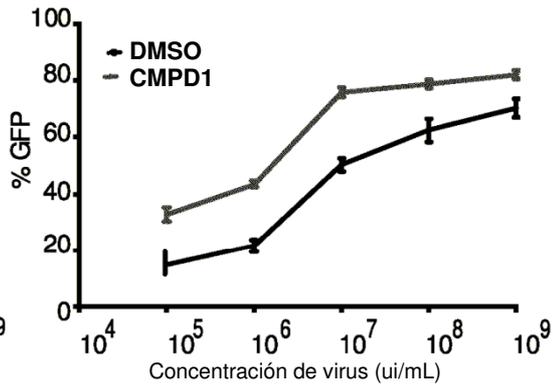


FIG. 6C

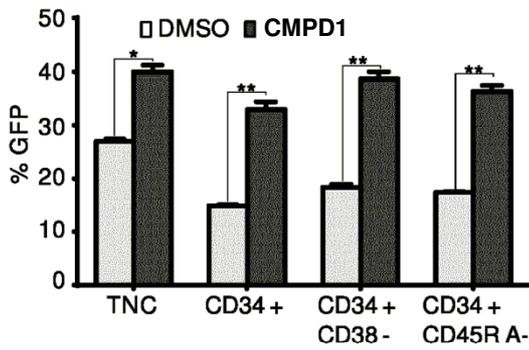


FIG. 6D

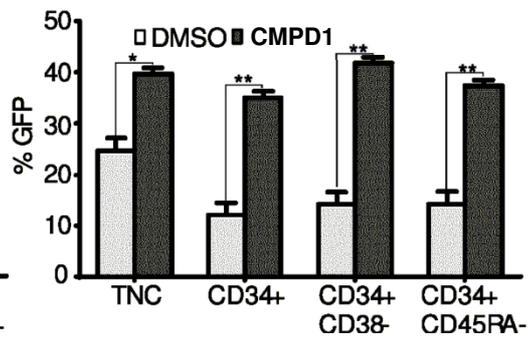


FIG. 6E

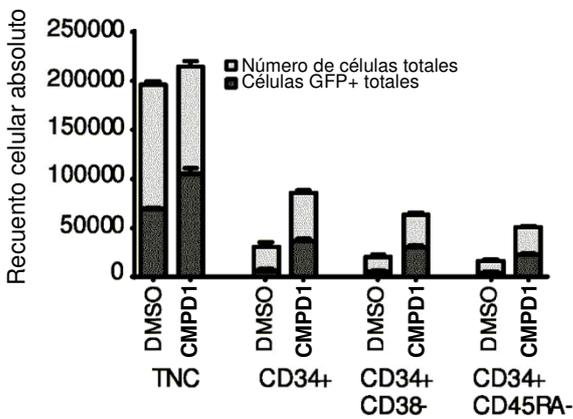


FIG. 6F

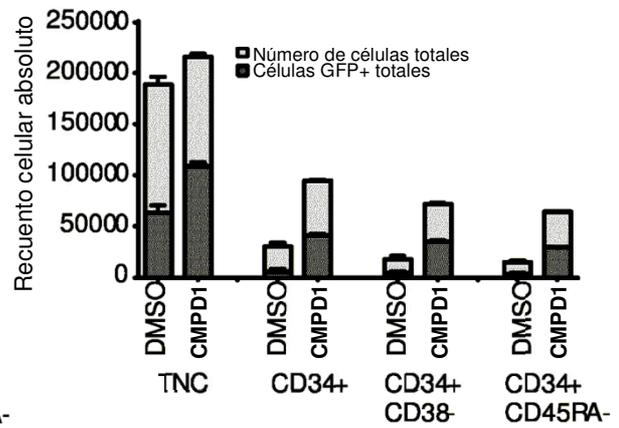


FIG. 6G

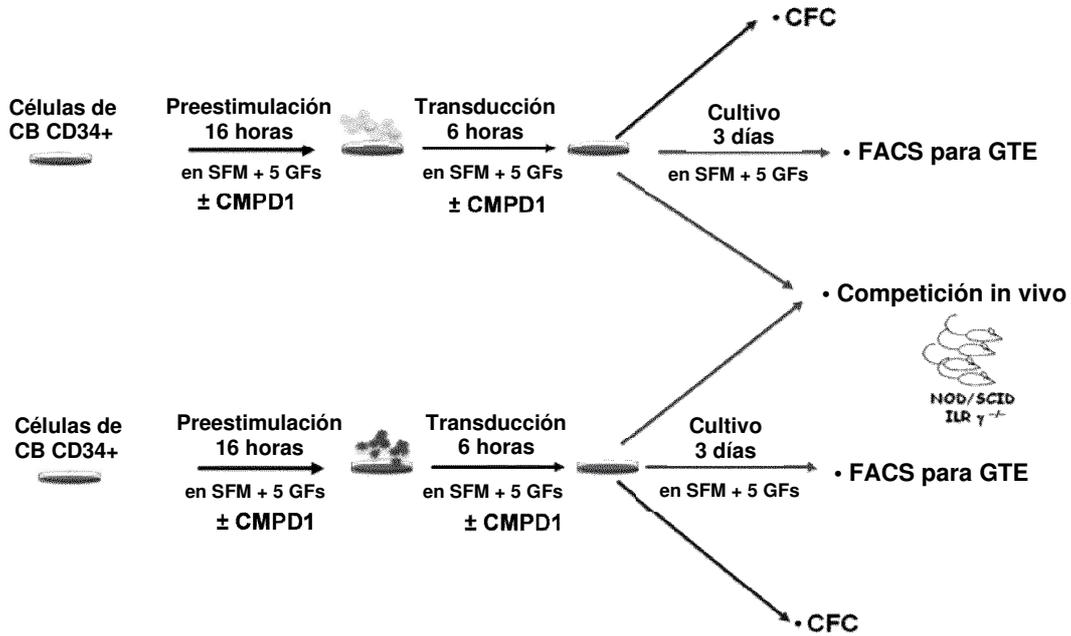


FIG. 7A

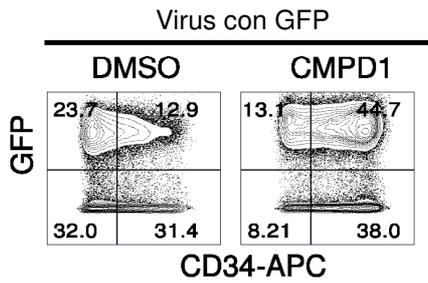


FIG. 7B

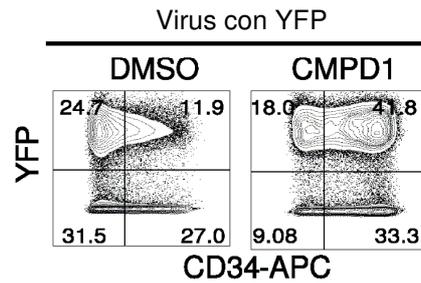


FIG. 7C

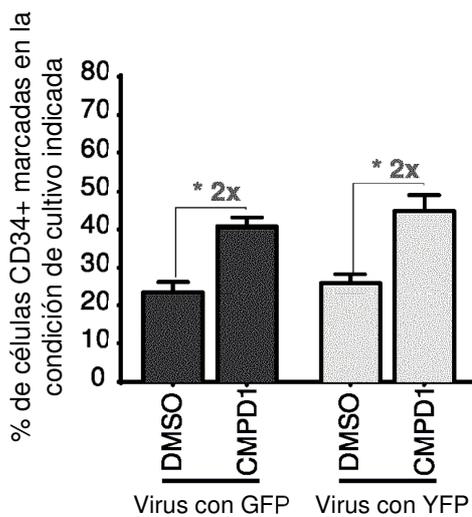


FIG. 7D

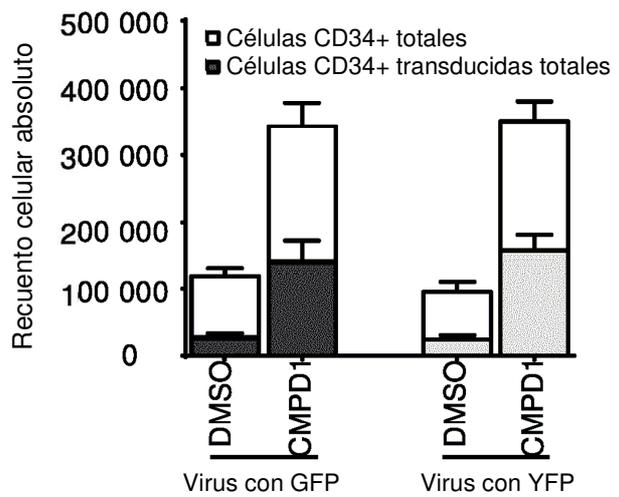


FIG. 7E

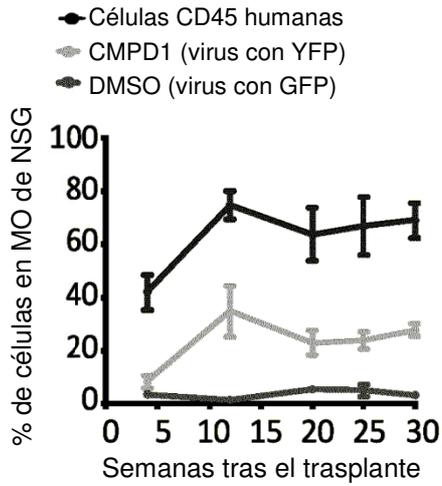


FIG. 7F

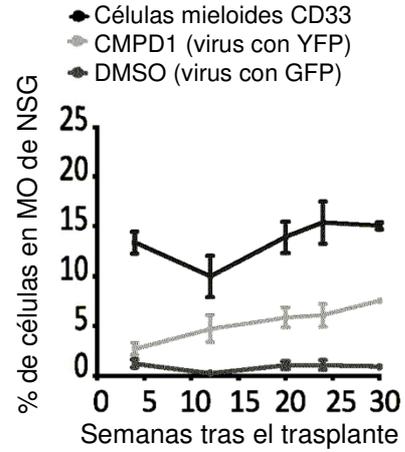


FIG. 7G

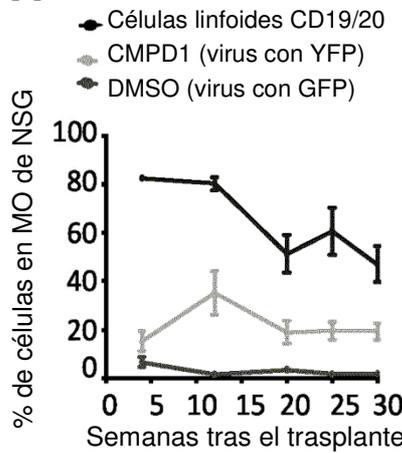


FIG. 7H

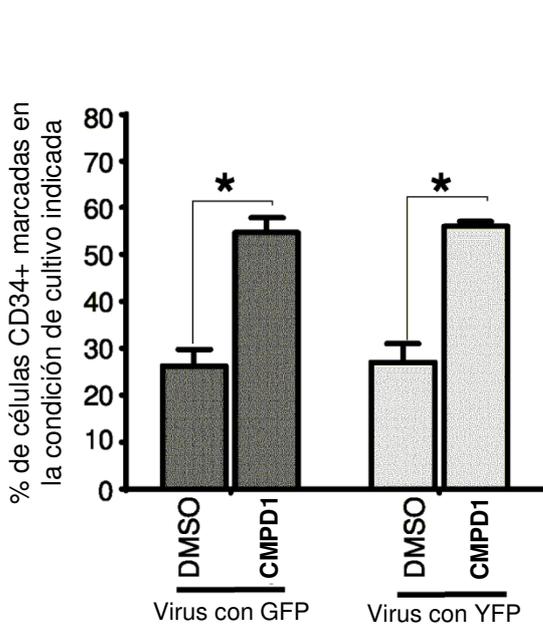


FIG. 8A

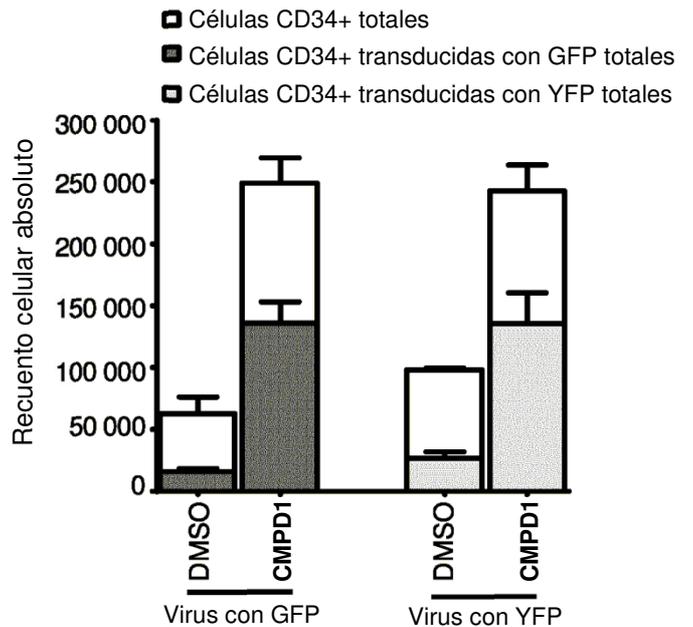


FIG. 8B

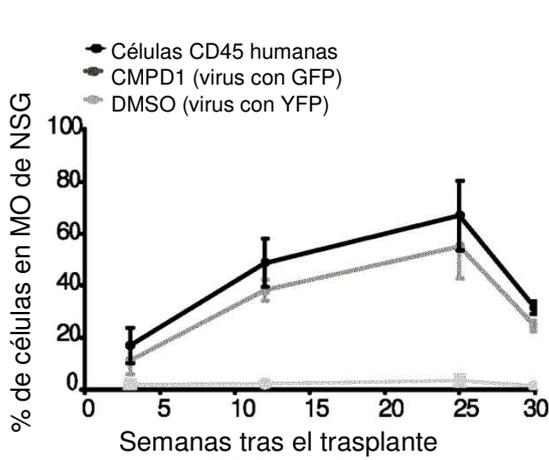


FIG. 8C

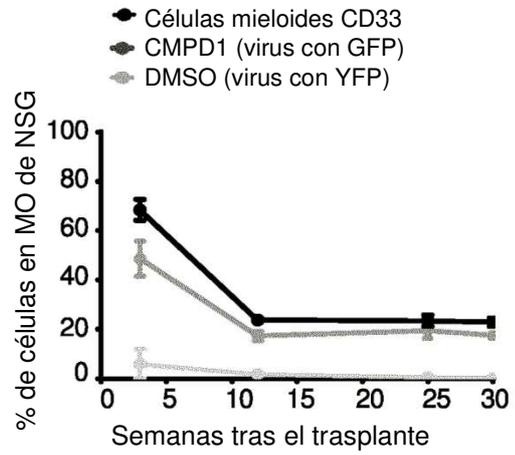


FIG. 8D

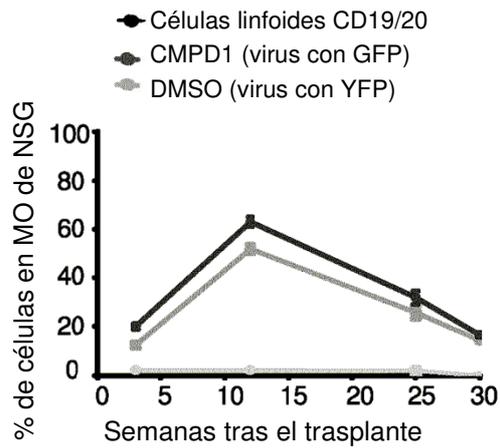


FIG. 8E

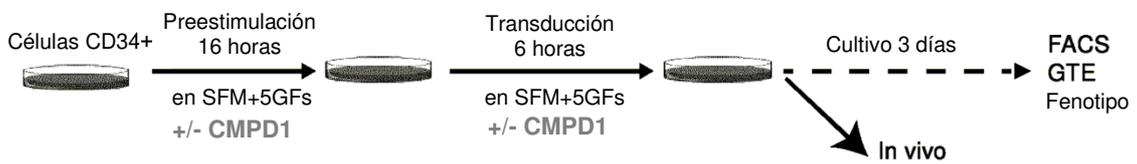


FIG. 9A

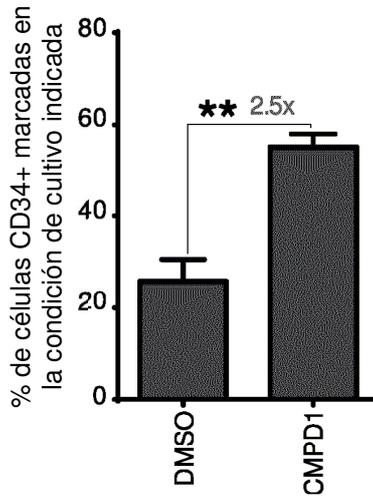


FIG. 9B

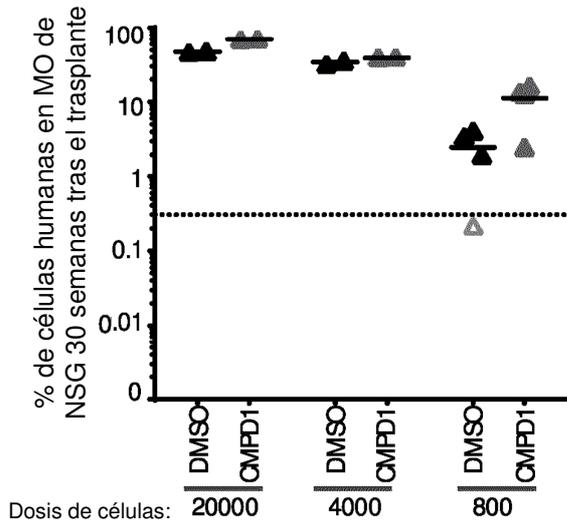


FIG. 9C

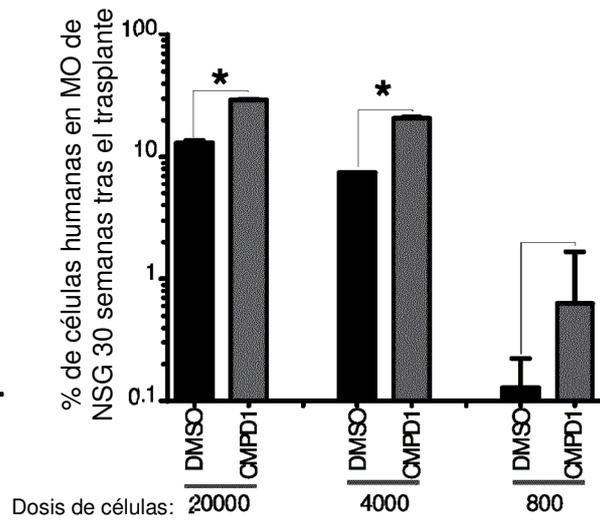


FIG. 9D

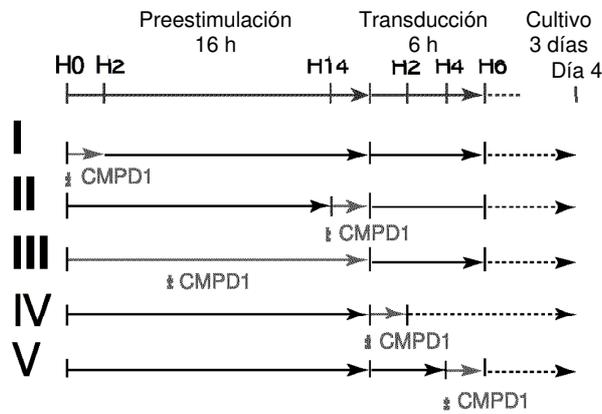


FIG. 10A

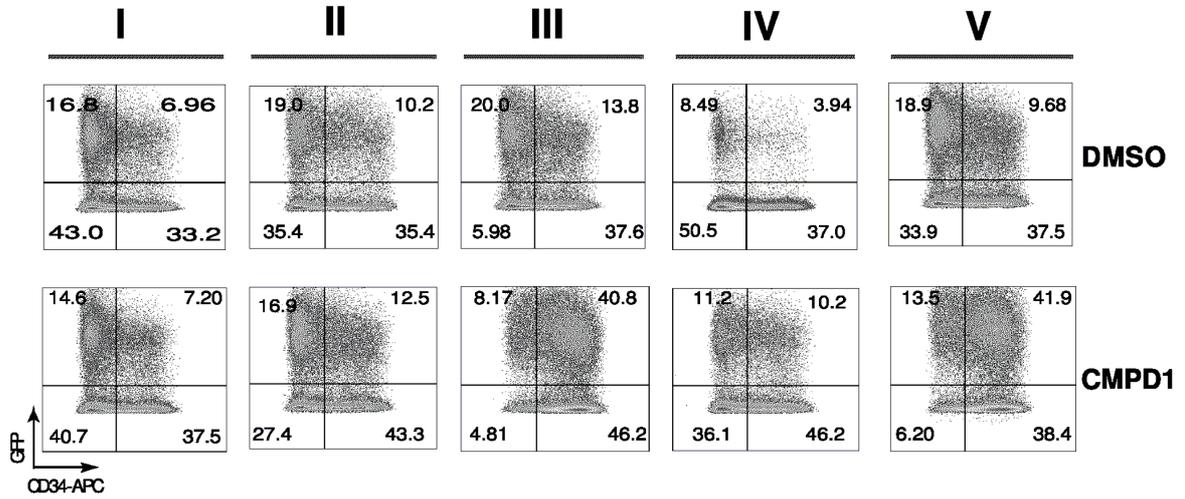


FIG. 10B

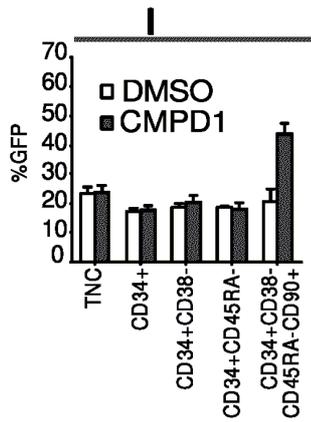


FIG. 10C

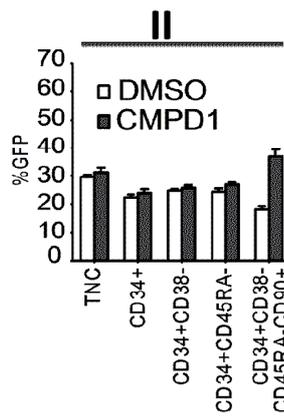


FIG. 10D

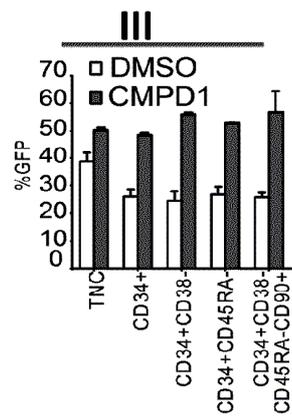


FIG. 10E

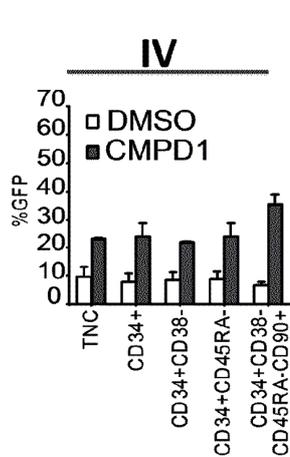


FIG. 10F

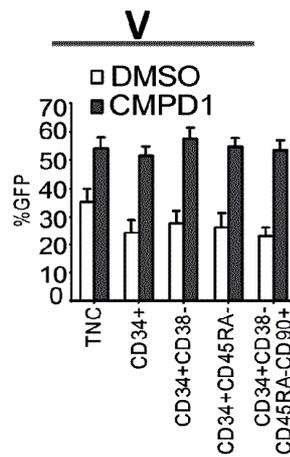


FIG. 10G

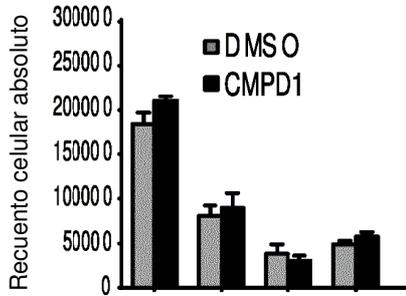


FIG. 10H

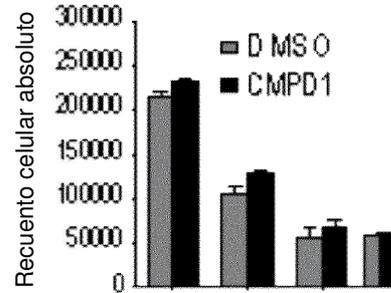


FIG. 10I

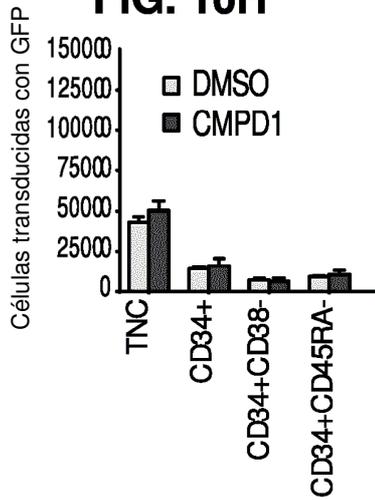


FIG. 10M

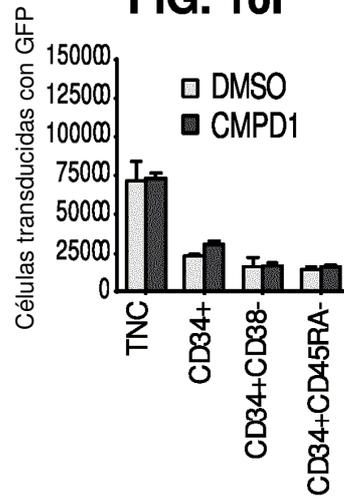


FIG. 10N

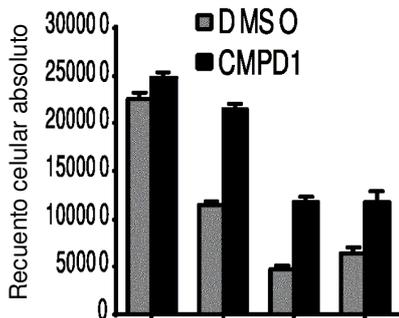


FIG. 10J

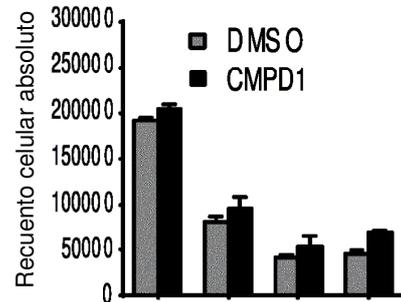


FIG. 10K

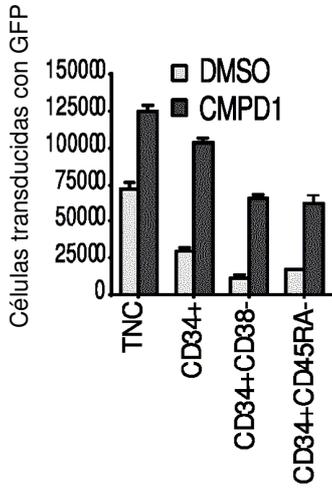


FIG. 10O

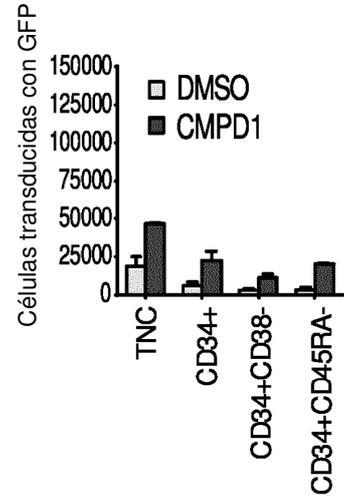


FIG. 10P

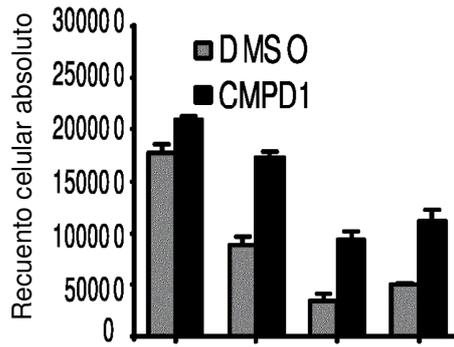


FIG. 10L

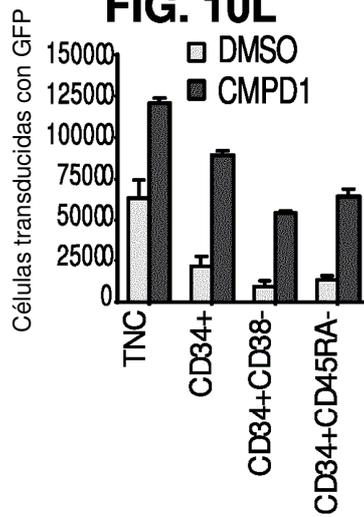


FIG. 10Q

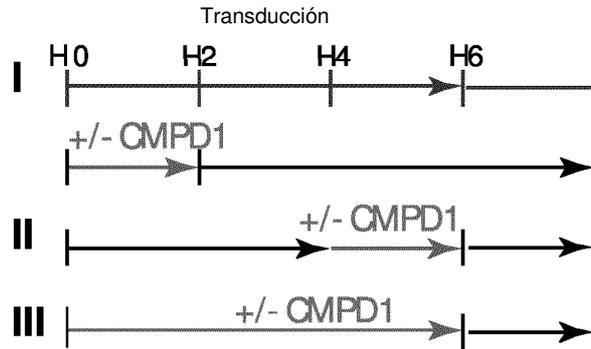


FIG. 11A

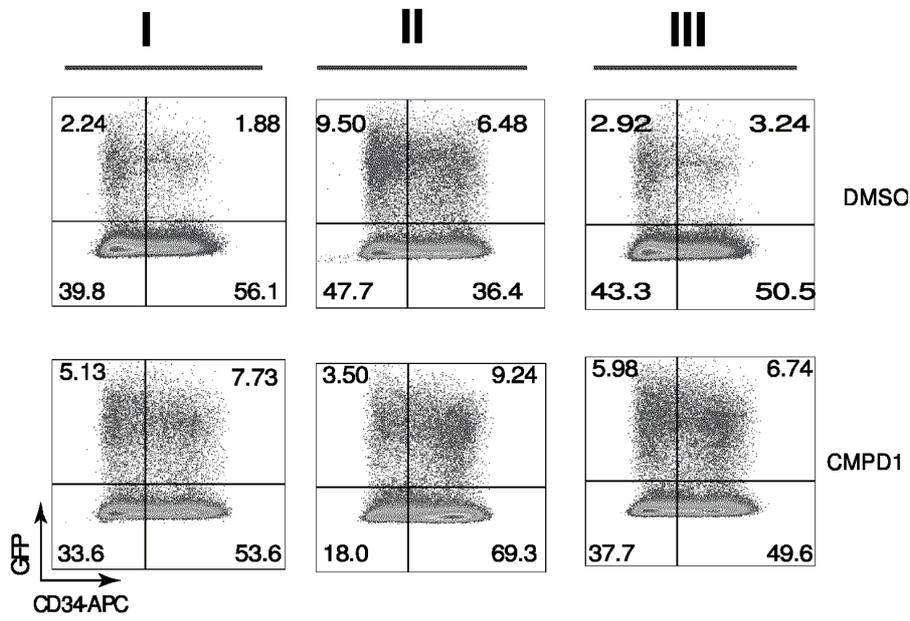


FIG. 11B

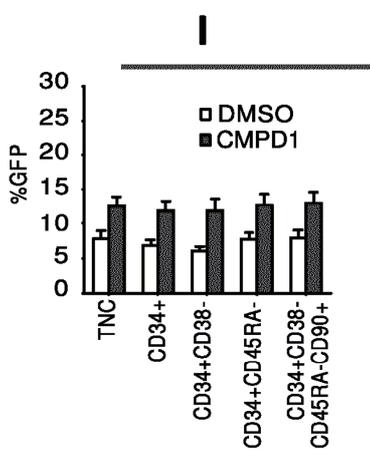


FIG. 11C

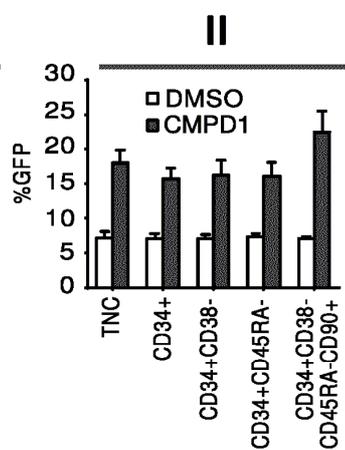


FIG. 11D

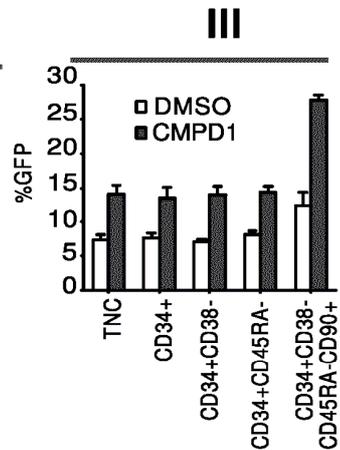


FIG. 11E

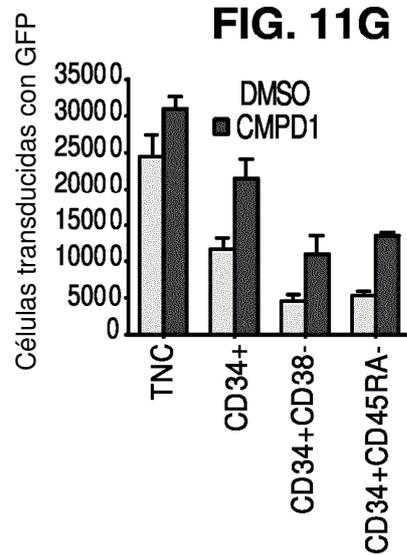
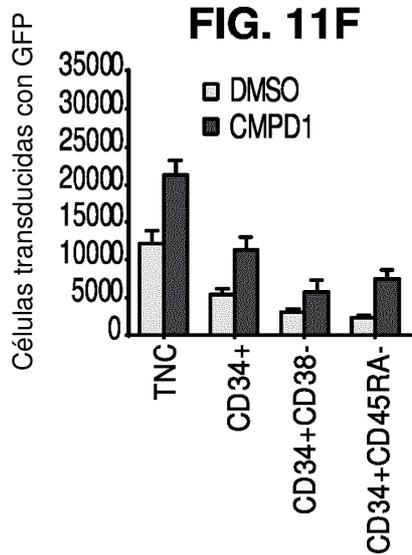
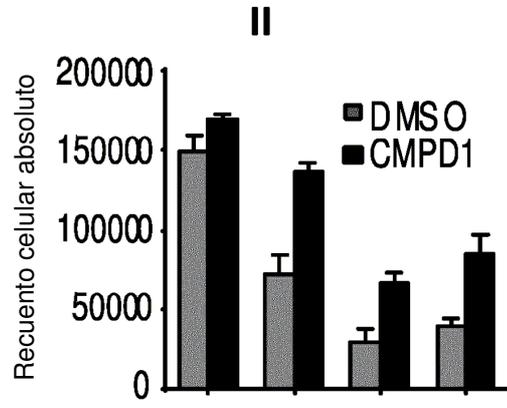
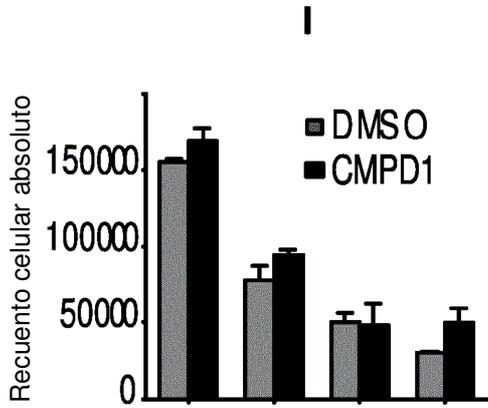


FIG. 11I

FIG. 11J

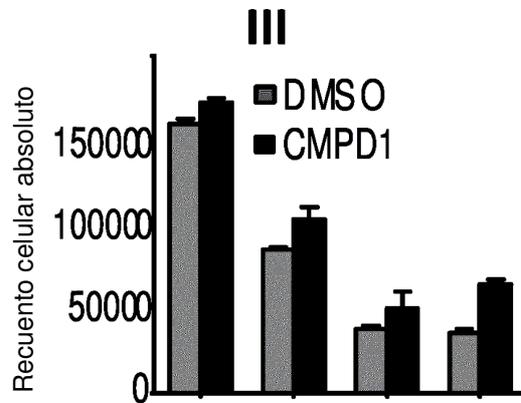


FIG. 11H

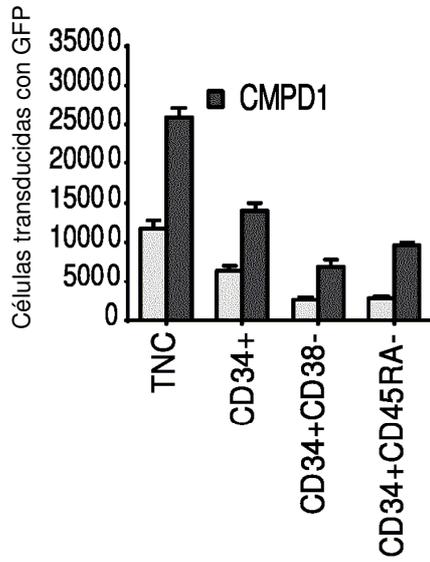


FIG. 11K

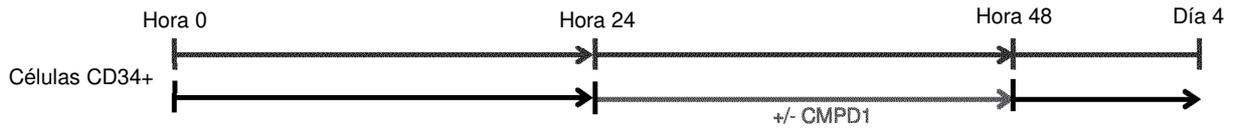


FIG. 12A

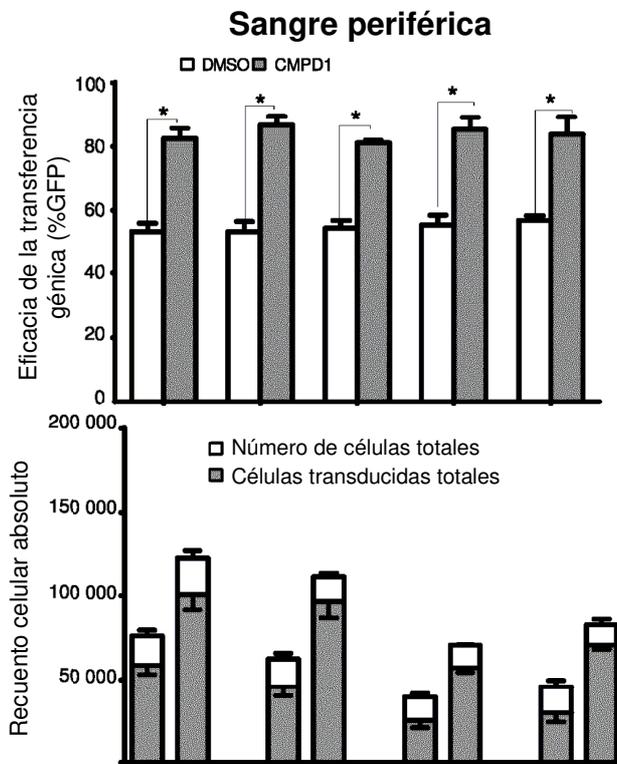


FIG. 12B

Médula ósea

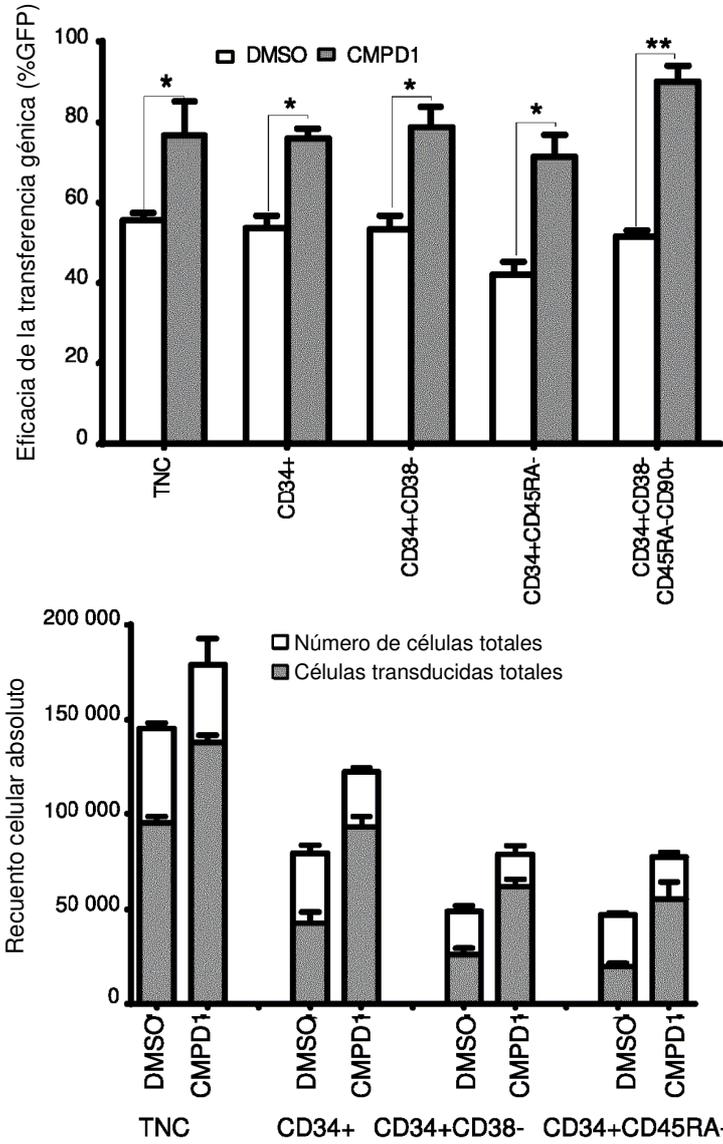


FIG. 12C

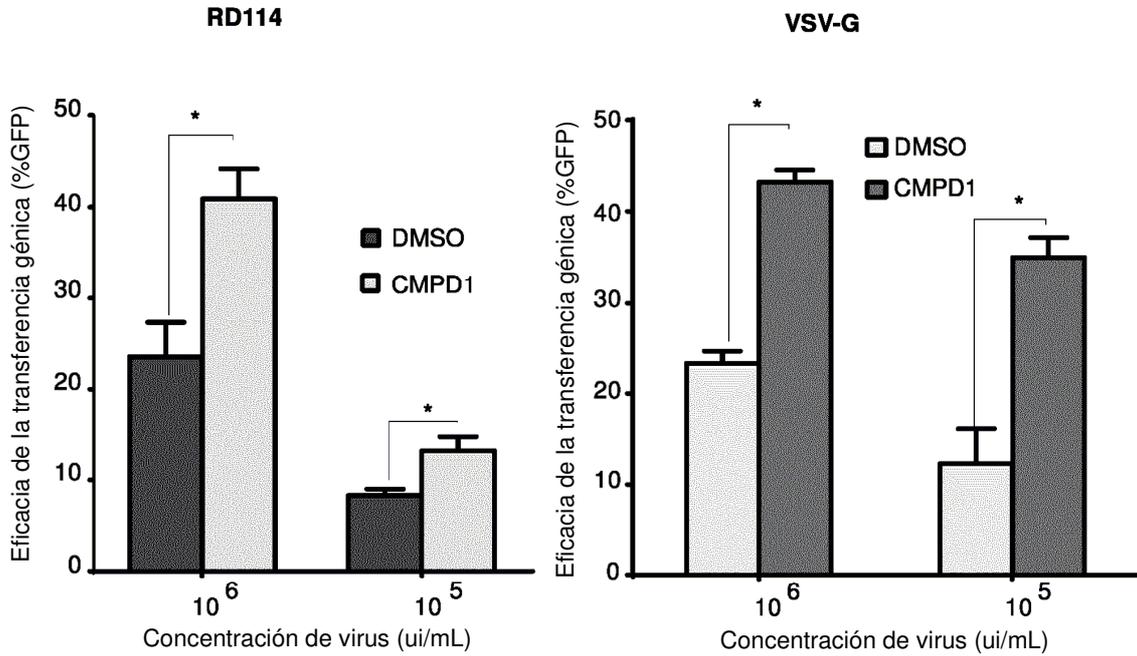


FIG. 13A

FIG. 13B



FIG. 13C

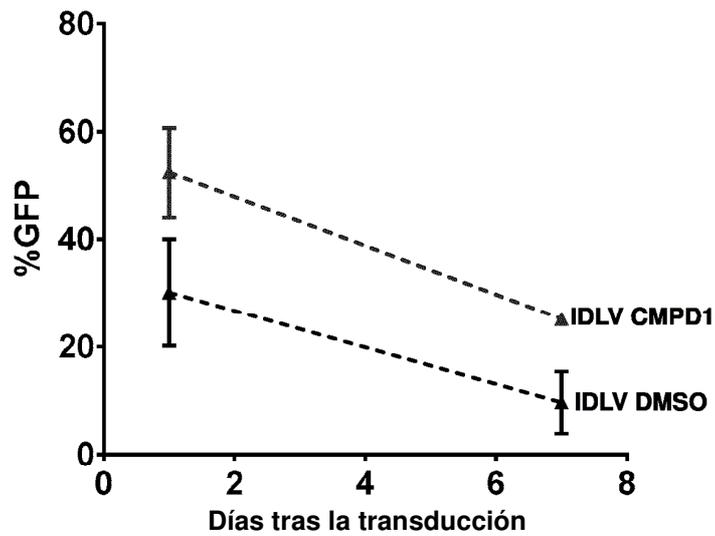


FIG. 13D

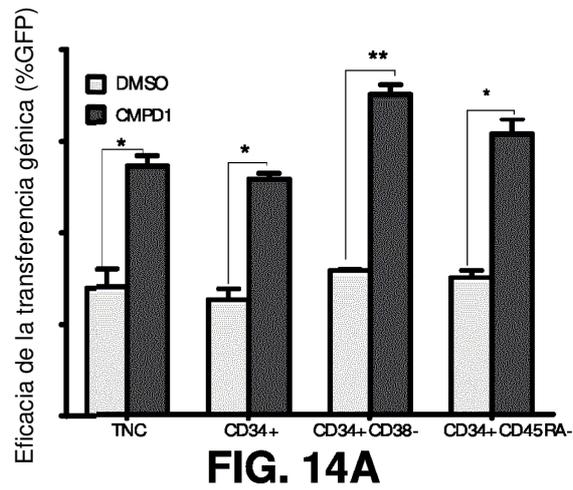
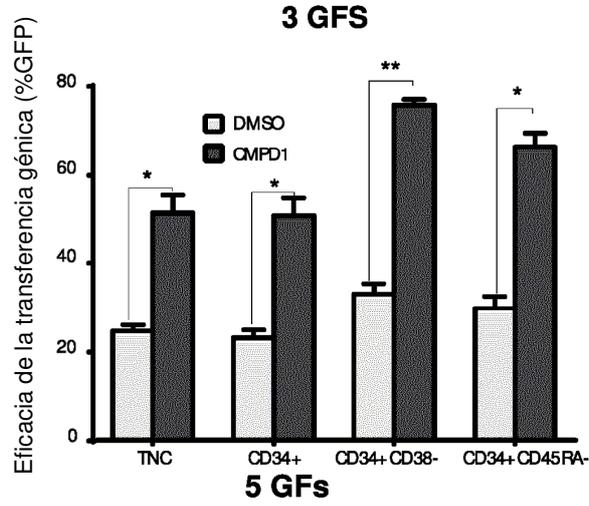


FIG. 14A

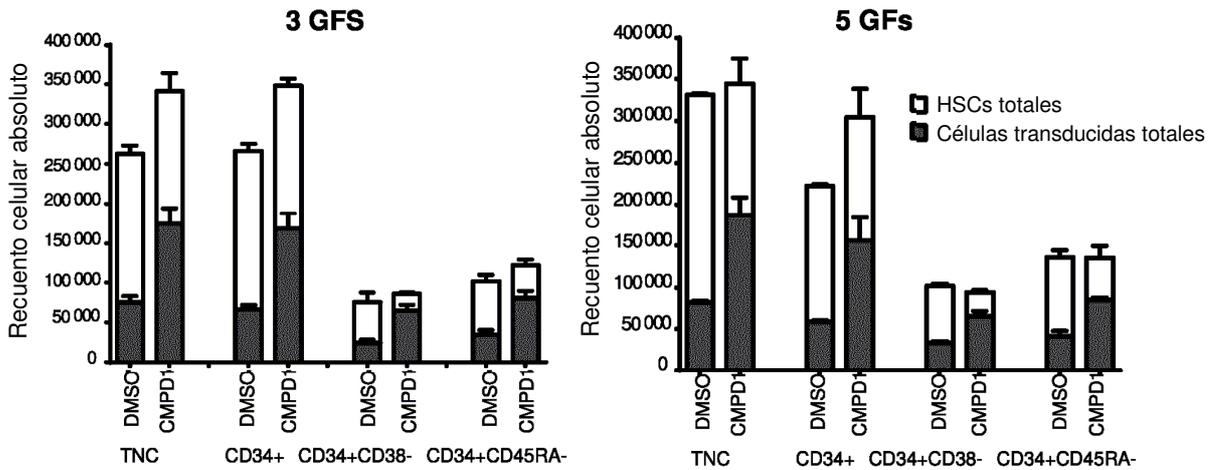


FIG. 14B

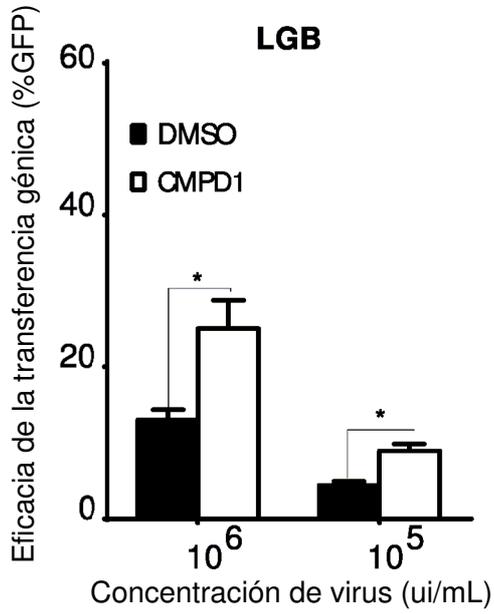


FIG. 15A

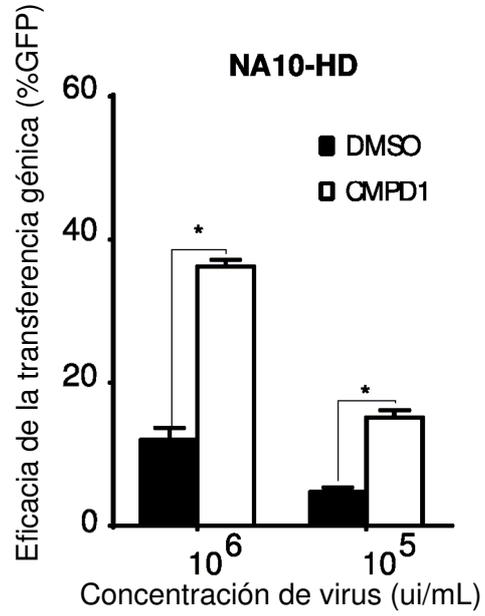


FIG. 15B

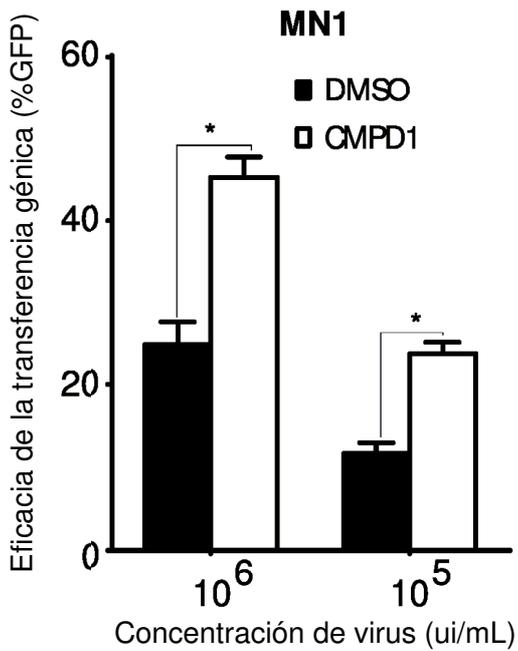


FIG. 15C

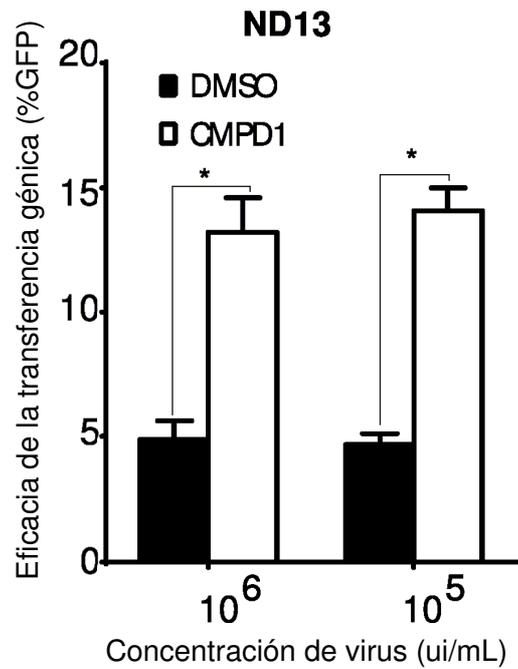


FIG. 15D

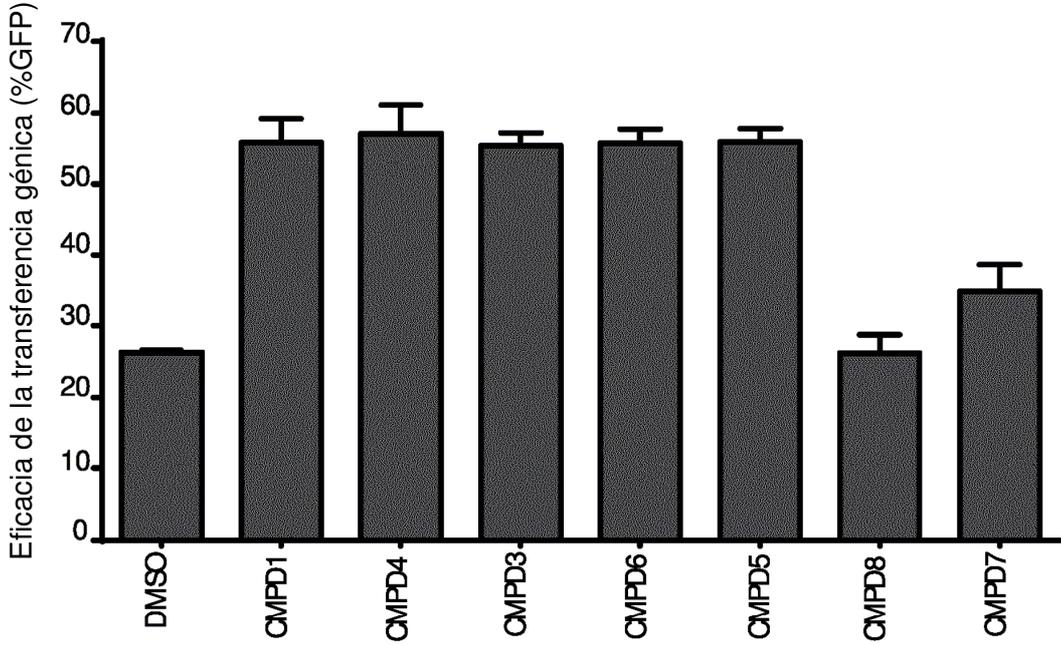


FIG. 16A

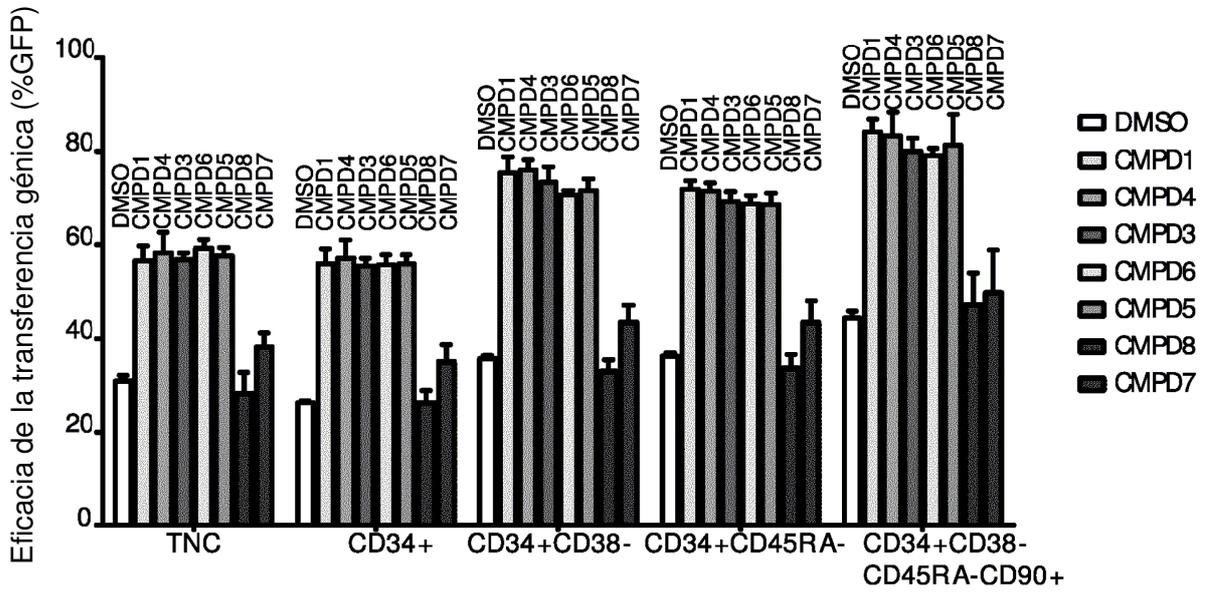


FIG. 16B

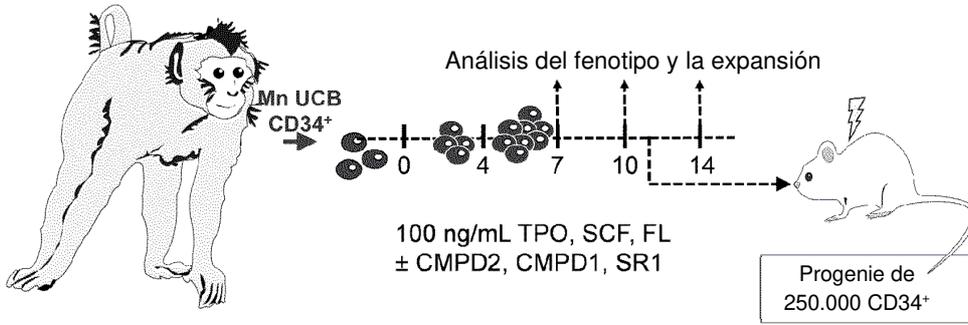


FIG. 17A

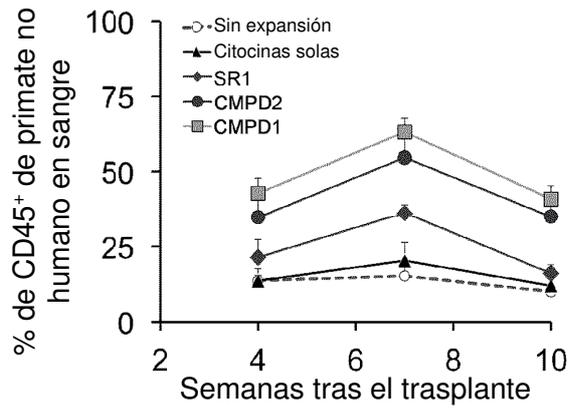


FIG. 17B

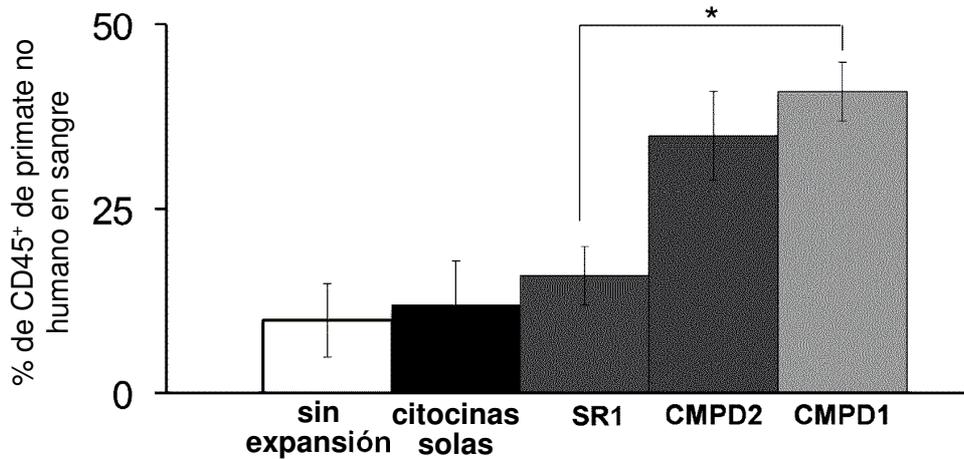


FIG. 17C

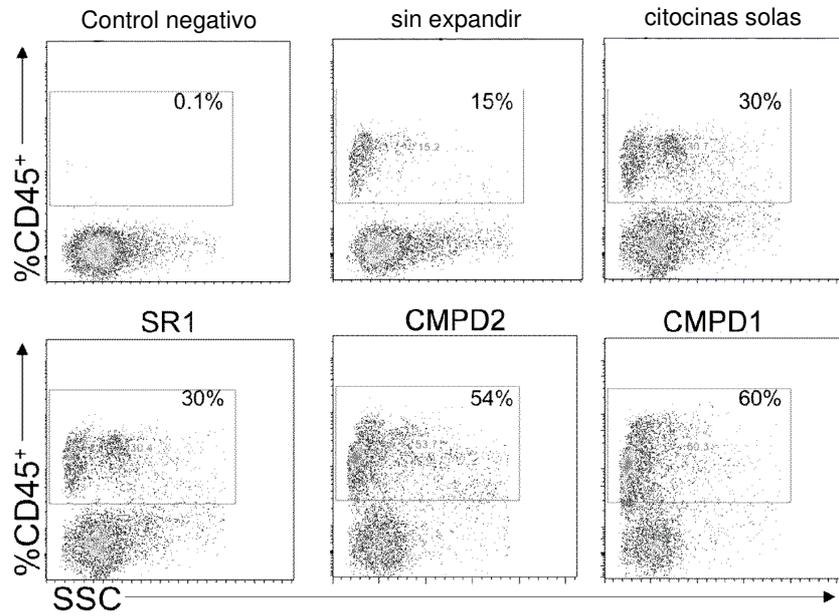


FIG. 17D

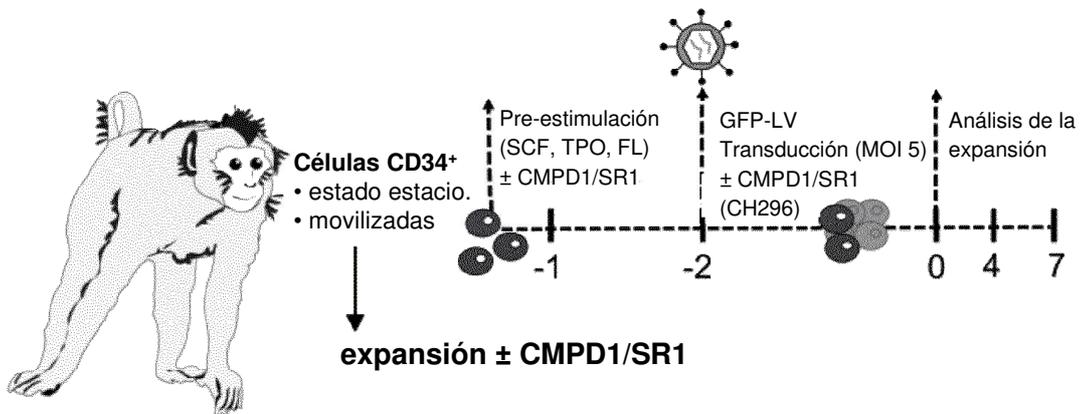


FIG. 18A

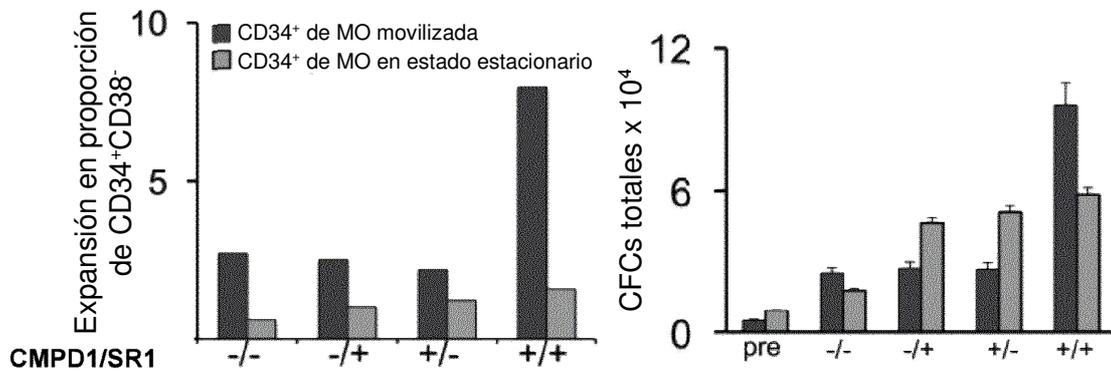


FIG. 18B

Médula ósea transducida en estado estacionario

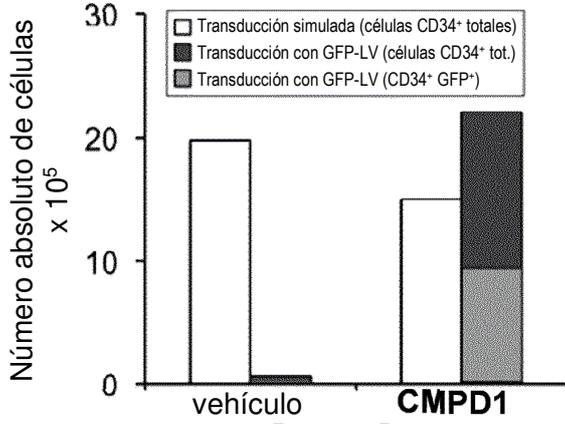


FIG. 18C

Médula ósea movilizada transducida

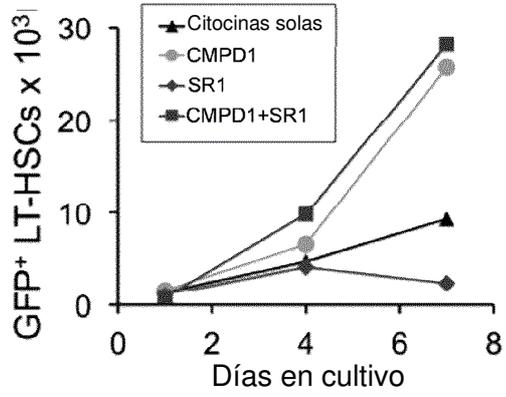


FIG. 18D

Médula ósea movilizada transducida

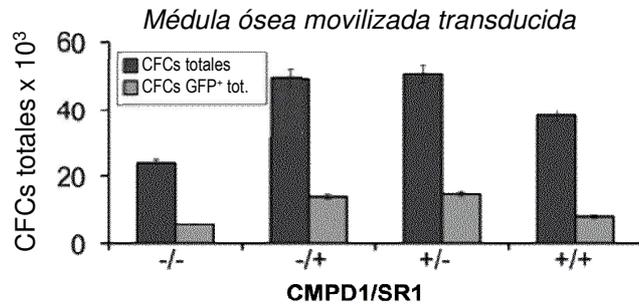
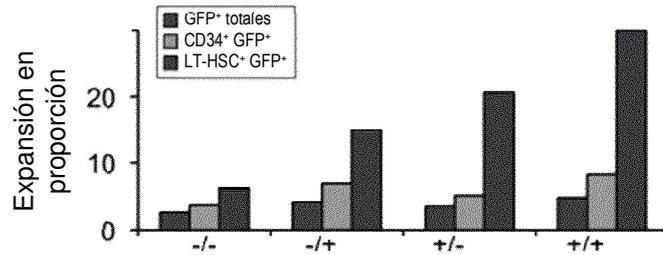


FIG. 18E

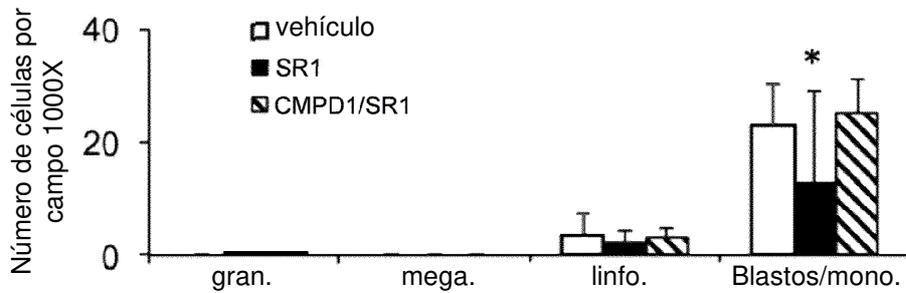


FIG. 18F

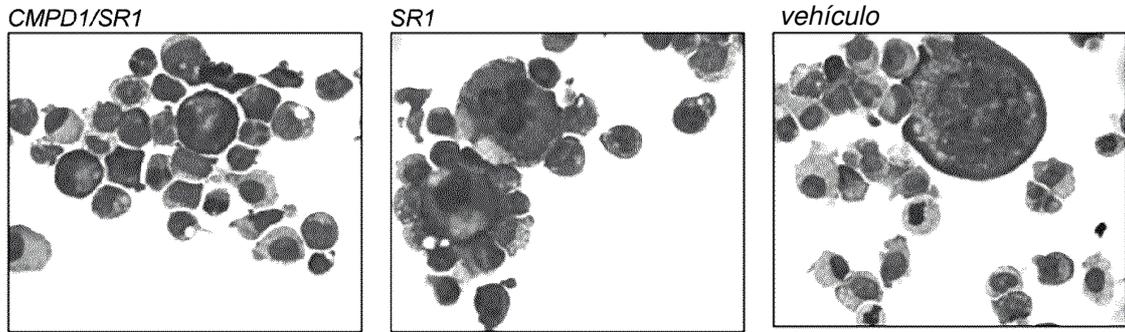


FIG. 18G

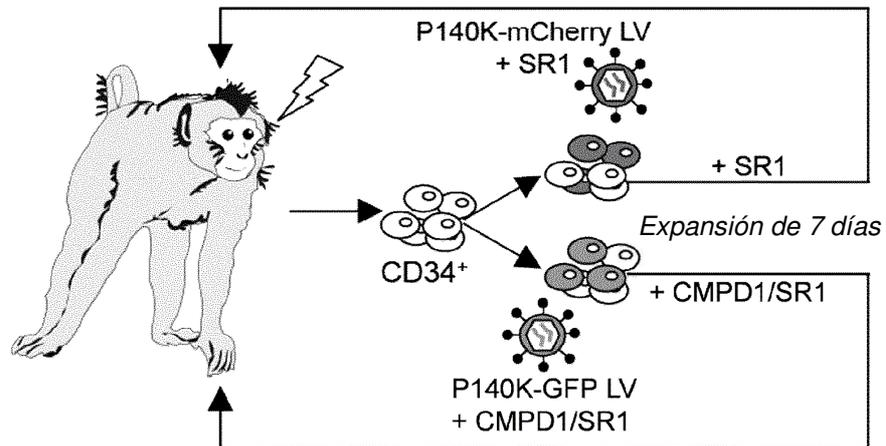


FIG. 19A

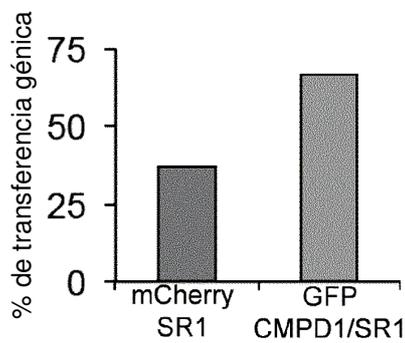


FIG. 19B

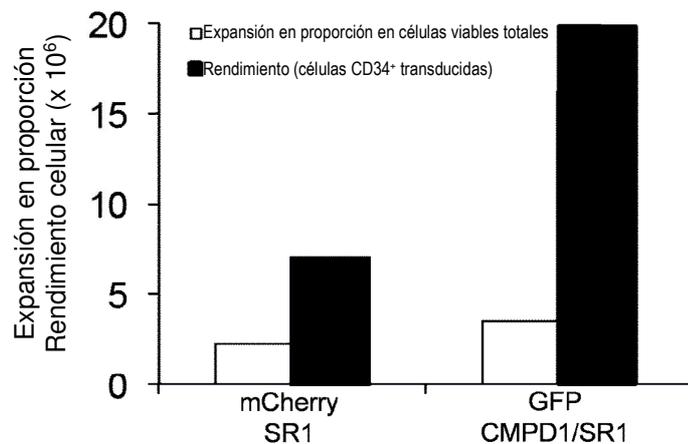


FIG. 19C

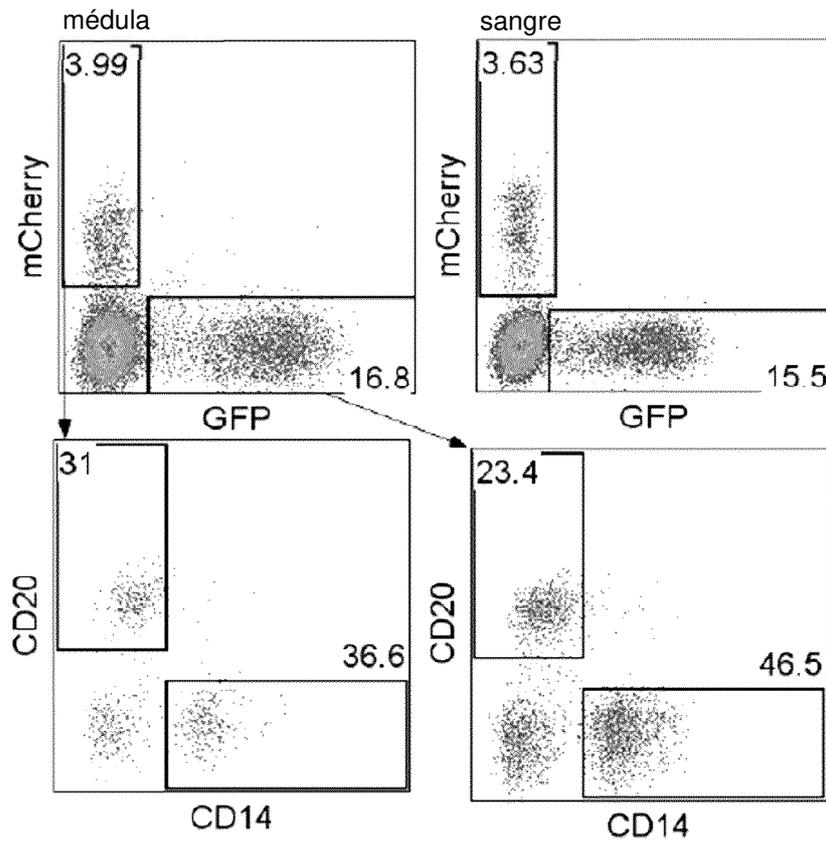


FIG. 19D

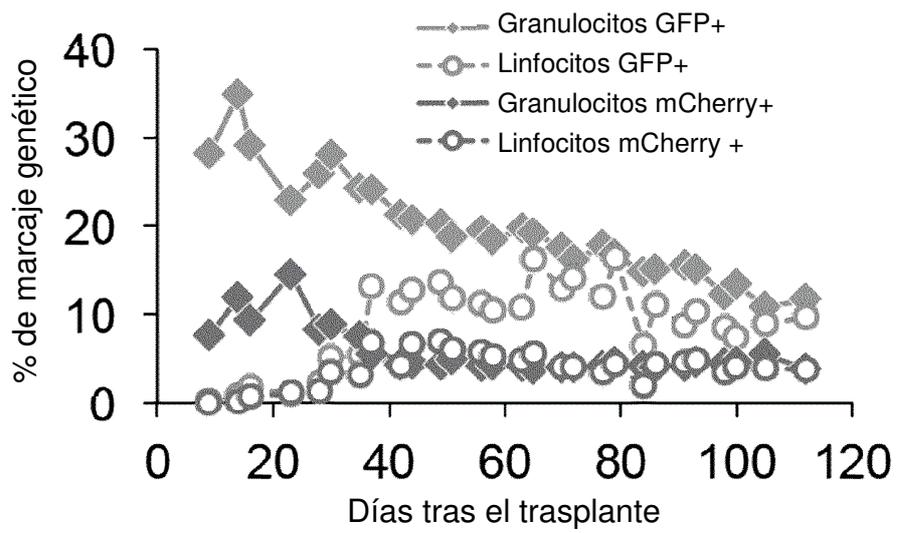


FIG. 19E

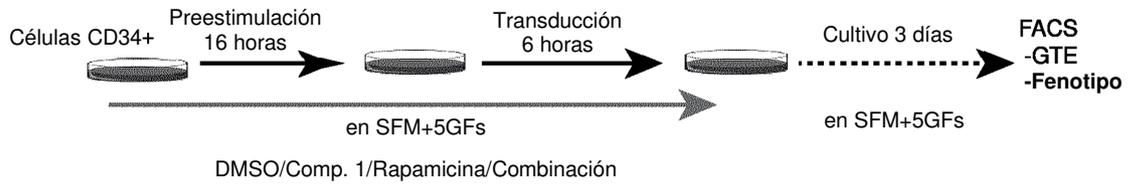


FIG. 20A

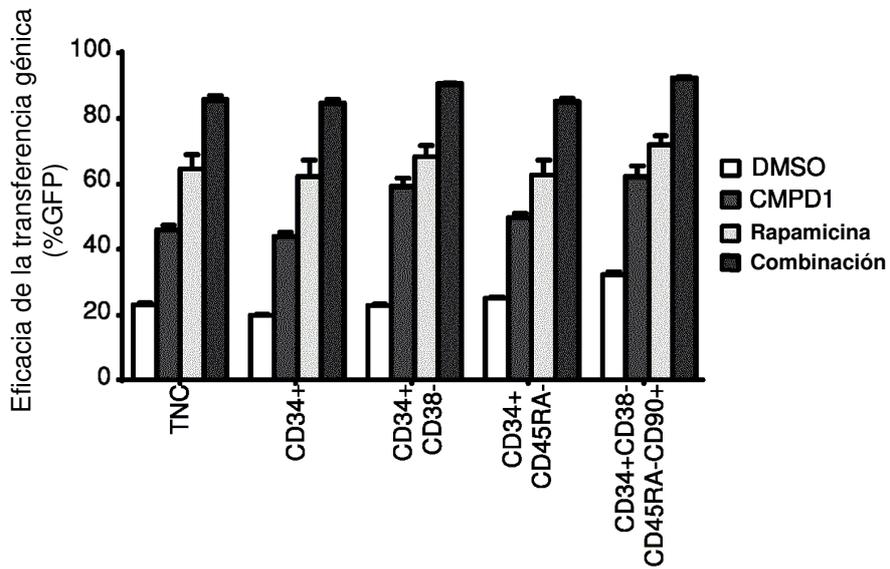


FIG. 20B

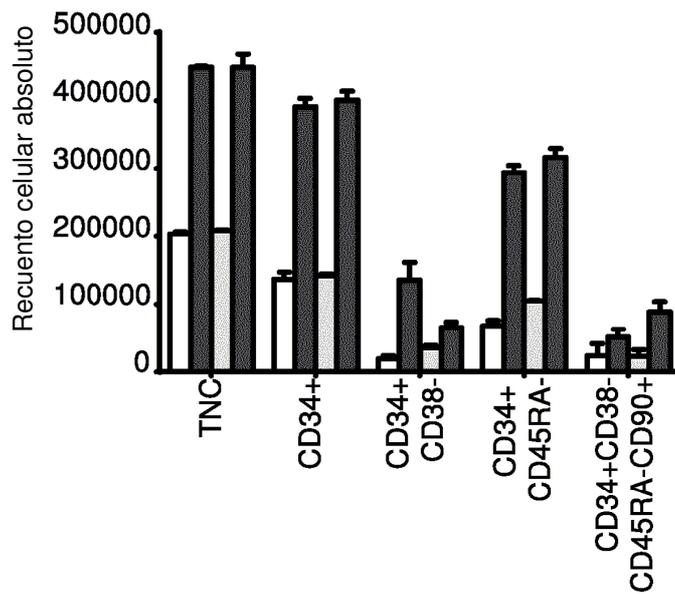


FIG. 20C

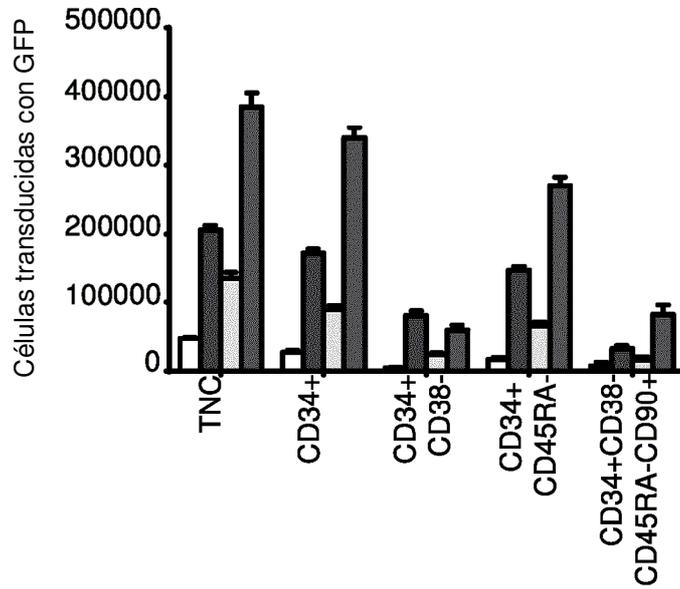


FIG. 20D

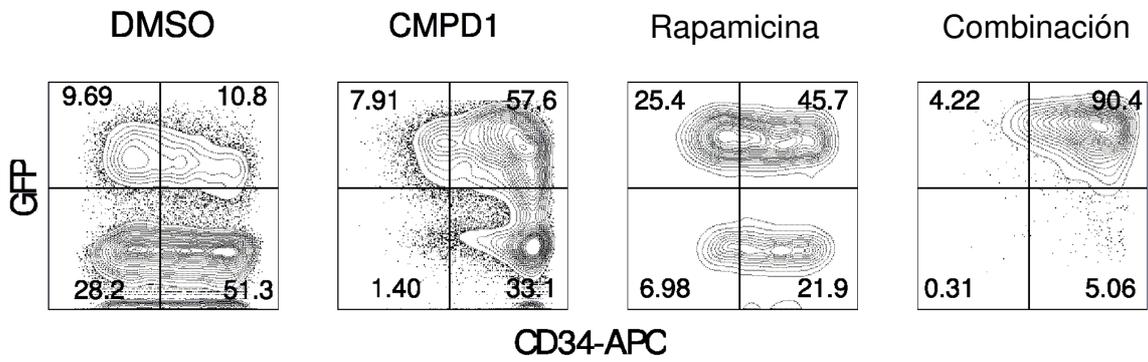


FIG. 20E