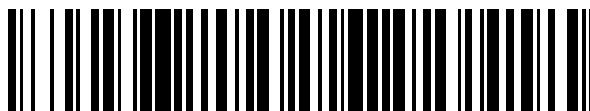


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 265**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0735** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2009** **E 13163291 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2664669**

54 Título: **Tratamiento de células pluripotentes**

30 Prioridad:

**24.04.2008 US 108852**

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

**26.02.2018**

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)**  
**800/850 Ridgeview Drive**  
**Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**DAVIS, JANET, E. y**  
**LIU, JIAJIAN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 656 265 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).

**Tratamiento de células pluripotentes****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se dirige a métodos para tratar las células pluripotentes, por lo que las células pluripotentes se pueden ampliar de manera eficiente en cultivo y diferenciarse mediante el tratamiento de las células pluripotentes con un inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B.

10

**FONDO**

Los avances en la terapia de reemplazo de células para la diabetes mellitus de tipo I y la escasez de islotes trasplantables de Langerhans han centrado el interés en el desarrollo de fuentes de células productoras de insulina, o células  $\beta$ , apropiadas para el injerto. Un enfoque es la generación de células funcionales  $\beta$  a partir de células pluripotentes, tales como, por ejemplo, células madre embrionarias.

15

En el desarrollo embrionario de los vertebrados, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprenden tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como la gastrulación. Los tejidos tales como, por ejemplo, la tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado, se desarrollará a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso es la formación de endodermo definitivo. Células de endodermo definitivas expresan un número de marcadores, tales como, HNF-3 beta, GATA-4, Mix11, CXCR4 y Sox-17.

20

La formación del páncreas surge de la diferenciación de endodermo definitivo en endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox pancreaticoduodenal, Pdx-1. En ausencia de Pdx-1, el páncreas no logra desarrollarse más allá de la formación de yemas ventral y dorsal. Así, la expresión Pdx-1 marca un paso crítico en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Tejidos exocrinos y endocrinos surgen de la diferenciación de endodermo pancreático.

25

30

La generación de una cantidad suficiente de material celular para el trasplante requiere una fuente del material celular que se puede ampliar de manera eficiente en cultivo, y se puede diferenciar de manera eficiente en el tejido de interés, por ejemplo, células funcionales  $\beta$ .

35

Los métodos actuales a células madre embrionarias humanas de cultivo son complejos; que requieren el uso de factores exógenos, o medios químicamente definidos a fin de que las células proliferen sin perder su pluripotencia. Además, la diferenciación de células madre embrionarias a menudo resulta en una disminución en las células para expandir en cultivo.

40

En un ejemplo, Cheon *et al.* (BioReprod DOI: 10.1095/biolreprod.105.046870, 19 de octubre, 2005) describen un sistema de cultivo libre de suero libre de alimentador en el que se mantienen las células madre embrionarias en medio de sustitución de suero condicionado (SR) suplementado con factores de crecimiento diferentes capaces de desencadenar autorrenovación de células madre embrionarias.

45

En otro ejemplo, US20050233446 describe un medio definido util en el cultivo de células madre, incluyendo células madre primordiales de primates no diferenciados. En solución, los medios son sustancialmente isotónicos en comparación con las células madre que se cultiven. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio base y una cantidad de cada uno de bFGF, insulina y ácido ascórbico necesario para apoyar el crecimiento sustancialmente no diferenciado de las células madre primordiales.

50

En otro ejemplo, W02005086845 describe un método para el mantenimiento de una célula madre no diferenciada, comprendiendo dicho método la exposición de una célula madre a un miembro de familia de factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) de proteínas, un miembro de la familia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) de proteínas, o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado no diferenciado durante una cantidad de tiempo suficiente para conseguir un resultado deseado.

55

Se conocen inhibidores de quinasa-3 de sintasa de glucógeno (GSK-3) para promover la proliferación y la expansión de células madre adultas. En un ejemplo, Tateishi *et al.* (Biochemical and Biophysical Research Communications (2007) 352: 635) muestran que la inhibición de GSK-3 mejora el crecimiento y la supervivencia de las células humanas cardiacas madre (hCSCs) recuperadas del corazón humano neonatal o adulto y que tienen características mesenquimales.

60

Por ejemplo, Rulifson *et al.* (PNAS 144, 6247-6252, (2007)) establece que la "señalización Wnt estimula proliferación de islote de células  $\beta$ .

65

En otro ejemplo, WO2007016485 informa que la adición de los inhibidores de GSK-3 al cultivo de células madre no embrionarias, incluyendo las células progenitoras adultas multipotentes, conduce al mantenimiento de un fenotipo pluripotente durante la expansión y resulta en una respuesta de diferenciación más robusta.

5 En otro ejemplo, US2006030042 utiliza un método de inhibición de GSK-3, ya sea por adición de Wnt o un inhibidor de molécula pequeña de la actividad enzimática de GSK-3, para mantener células madre embrionarias sin el uso de una capa de células alimentadoras.

10 En otro ejemplo, WO2006026473 informa de la adición de un inhibidor GSK-3B, para estabilizar las células pluripotentes a través de la activación transcripcional de c-myc y estabilización de proteína c-myc.

15 En otro ejemplo, WO2006100490 informa del uso de un medio de cultivo de células madre que contiene un inhibidor de GSK-3 y un agonista gp130 para mantener una población de autorenovación de células madre pluripotentes, incluyendo células madre embrionarias de ratón o humanas.

20 En otro ejemplo, Sato *et al.* (Nature Medicine (2004) 10:55-63) muestran que la inhibición de GSK-3 con un compuesto farmacológico específico puede mantener el fenotipo no diferenciado de las células madre embrionarias y sostener la expresión de factores de transcripción pluripotentes de estado específico tales como Oct-3/4, Rex-1, y Nanog.

25 En otro ejemplo, Maurer *et al.* (Journal of Proteome Research (2007) 6: 1198-1208) muestran que las células madre adultas neuronales tratadas con un inhibidor de GSK-3 muestran mayor diferenciación neuronal, específicamente mediante la promoción de la transcripción de genes diana  $\beta$ -catenina y la disminución de la apoptosis.

30 En otro ejemplo, Gregory *et al.* (Annals of the New York Academy of Sciences (2005) 1049: 97-106) informan de que los inhibidores de GSK-3B mejoran la osteogénesis *in vitro*.

35 En otro ejemplo, Feng *et al.* (Biochemical and Biophysical Research Communications (2004) 324: 1333-1339) muestran que la diferenciación hematopoyética a partir de células madre embrionarias se asocia con la regulación por disminución de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina, donde Wnt es un inhibidor natural de GSK-3.

40 Por lo tanto, sigue existiendo una importante necesidad de desarrollar métodos para el tratamiento de células madre pluripotentes tal que pueden ser expandidas para hacer frente a las necesidades clínicas actuales, al tiempo que conserva el potencial de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, células pancreáticas que expresan hormona, o células pancreáticas que secretan hormonas.

## SUMARIO

45 La presente invención proporciona un procedimiento para expandir y diferenciar células pluripotentes mediante al tratamiento de las células pluripotentes con un inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B.

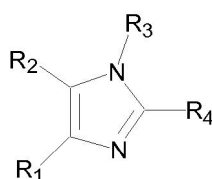
En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para expandir y diferenciar las células pluripotentes, que comprende las etapas de:

- 45 a. Cultivar células pluripotentes, y  
b. Tratar las células pluripotentes con un inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B.

50 En una realización, las células pluripotentes se diferencian en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

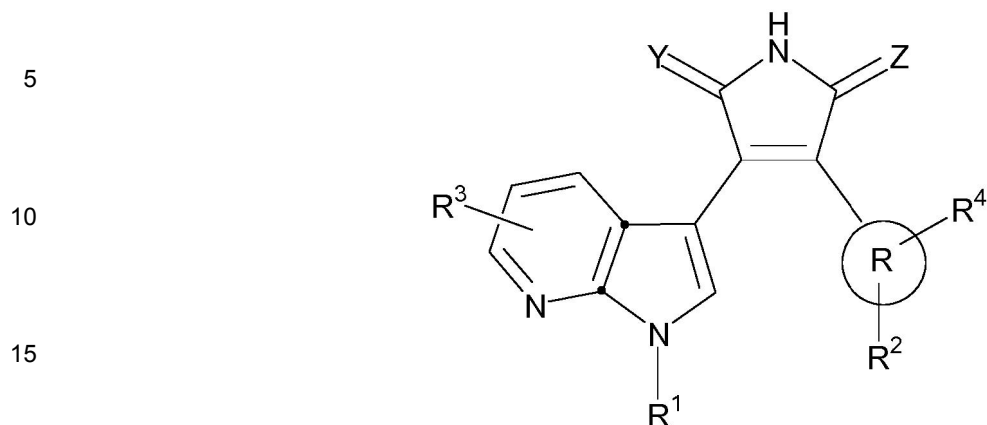
55 Las células pluripotentes pueden ser células madre embrionarias humanas, o pueden ser células que expresan marcadores de pluripotencia derivados de células madre embrionarias humanas, de acuerdo con los métodos descritos en 60/913475.

En una divulgación, el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B es un compuesto de la Fórmula (I):



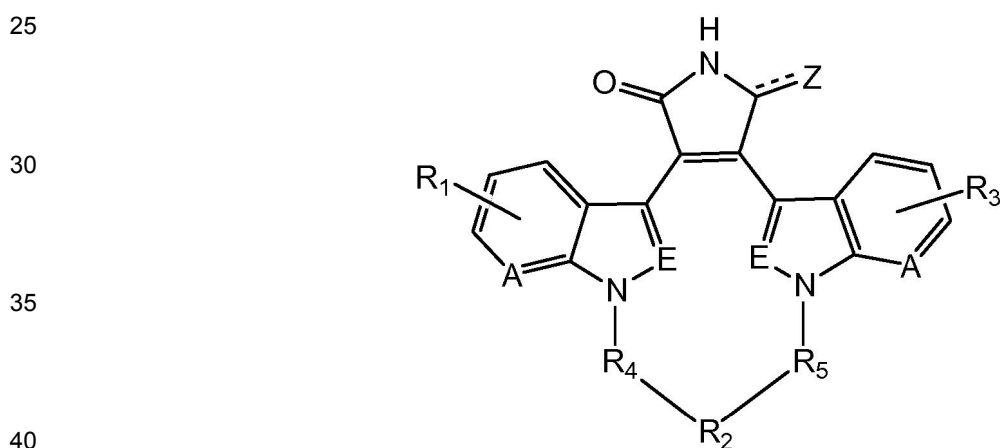
Formula (I)

En una divulgación, el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B es un compuesto de la Fórmula (II):



20  
Formula (II)

En una divulgación, el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B es un compuesto de la Fórmula (III):



45  
Formula (III)

#### 45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra el efecto de una gama de concentraciones del compuesto de JNJ 17189731 en el número de células, como se determina por el número de núcleos observados (Panel A) y la expresión Sox-17, como se determina por la intensidad de la tinción inmunofluorescente (Panel B). Los resultados se obtuvieron a partir de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (barras blancas), o células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (barras negras), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare).

La **Figura 2** muestra el efecto de una gama de concentraciones del compuesto de JNJ 17163796 en número de células, como se determina por el número de núcleos observados (Panel A) y expresión de Sox-17, tal como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B). Los resultados se obtuvieron de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (barras blancas), o células de la línea humana embrionaria de células madre H9 (barras negras), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare).

La **Figura 3** muestra el efecto de una gama de concentraciones del compuesto de JNJ 17223375 en el número de células, como se determina por el número de núcleos observados (Panel A) y expresión Sox 17, tal como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B). Los resultados se obtuvieron a partir de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (barras blancas), o células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (barras negras), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare).

La **Figura 4** muestra el efecto de una gama de concentraciones del compuesto de JNJ 18157698 en el número

de células, como se determina por el número de núcleos observado (Panel A) y la expresión Sox-17, como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B). Los resultados se obtuvieron a partir de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (barras blancas), o células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (barras negras), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare).

La **Figura 5** muestra el efecto de una gama de concentraciones del compuesto de JNJ 26158015 en el número de células, como se determina por el número de núcleos observado (Panel A) y la expresión Sox-17, como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B). Los resultados se obtuvieron a partir de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (barras blancas), o células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (barras negras), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare).

La **Figura 6** muestra el efecto de una gama de concentraciones del compuesto de JNJ 26483197 en el número de células, como se determina por el número de núcleos observado (Panel A) y expresión Sox-17, tal como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B). Los resultados se obtuvieron a partir de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (barras blancas), o células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (barras negras), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare).

La **Figura 7** muestra el efecto de una gama de concentraciones del compuesto de JNJ 26483249 en el número de células, como se determina por el número de núcleos observado (Panel A) y la expresión Sox-17, como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B). Los resultados se obtuvieron a partir de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (barras blancas), o células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (barras negras), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare).

La **Figura 8** muestra el efecto de una gama de concentraciones del compuesto de JNJ 10220067 en el número de células, como se determina por el número de núcleos observado (Panel A) y Expresión Sox 17, tal como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B). Los resultados se obtuvieron a partir de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (barras blancas), o células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (barras negras), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare).

La **Figura 9** muestra la expresión de CXCR4 en la superficie de las células, como se determina por la tinción de inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo, en las células tratadas con los compuestos que se muestran, de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 8**.

La **Figura 10** muestra la expresión de CXCR4 (Panel A), HNF-3 beta (Panel B), y Sox-17 (Panel C), según lo determinado por PCR en tiempo real, en las células tratadas con los compuestos mostrados, de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 8**.

La **Figura 11** muestra el efecto de una gama de concentraciones de los compuestos que se muestran en el número de células, como se determina por el número de núcleos observados (Panel A) y la expresión de Pdx1, como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B), usando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare). Las células se trataron de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 9**.

La **Figura 12** muestra el efecto de una gama de concentraciones de los compuestos que se muestran en expresión Pdx-1 (barras blancas) y HNF-6 (barras negras), según lo determinado por PCR en tiempo real. Las células fueron tratadas de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 9**.

La **Figura 13** muestra el efecto de una gama de concentraciones de los compuestos que se muestran en el número de célula, tal como se determina por el número de núcleos observado (Panel A) y la expresión de insulina, tal como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B), utilizando el IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare). Las células se trataron de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 10**.

La **Figura 14** muestra el efecto de una gama de concentraciones de los compuestos que se muestran en la expresión Pdx-1 (barras blancas) y la insulina (barras negras), según lo determinado por PCR en tiempo real. Las células se trataron de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 10**.

La **Figura 15** muestra el efecto de una gama de concentraciones de los compuestos que se muestran en el número de células, como se determina por el número de núcleos observados (Panel A) y la expresión de insulina, como se determina por la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia (Panel B), usando la célula en Analizador de 1000 (GE Healthcare). Las células se trataron de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 11**.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las

siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

**Definiciones**

5 Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad en el nivel de células individuales tanto para autorenovación y se diferencian para producir células de la progenie, incluyendo progenitores de autorenovación, progenitores de no renovación y células diferenciadas terminalmente. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

15 Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, es decir, capaz de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, lo que significa capaz de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, que significa capaz de dar lugar a un subconjunto de los linajes de células, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una progenie que incluyen HSC (autorrenovación), progenitores oligopotentes de células sanguíneas restringidas y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, que significa capaz de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes de células que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, que significa capaz de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo células madre de espermatogénesis).

25 La diferenciación es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tales como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es una que se ha llevado en una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación a un punto en el que, en circunstancias normales, continuará para diferenciarse en un tipo celular específico o un subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de células menos diferenciadas. La desdiferenciación se refiere al proceso por el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se usa en el presente documento, el linaje de una célula define la heredibilidad de la célula, es decir, las células de las que provenía y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador de linaje específico se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de las células de un linaje de interés y se puede utilizar para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

40 "Linaje de células β" se refiere a células con la expresión de genes positiva para el factor de transcripción Pdx1 y por lo menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2.2, Nkx6.1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax-4 y Pax6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de células β incluyen células β.

45 "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo" como se usa en este documento se refieren a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-17, GATA-4, HNF-3 beta, GSC, Cerl, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA-6, CXCR4, C-Kit, CD99, o OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo incluyen células precursoras de racha primitiva, células de racha primitiva, células mesendodérmicas y células endodérmicas definitivas.

50 "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático", como se usa en el presente documento se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: Pdx-1, HNF-1beta, PTF1alfa, HNF-6, o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático incluyen células del endodermo pancreático.

55 "Células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático", como se usa en el presente documento se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: NGN-3, NeuroD, Islote-1, Pdx-1, NKX6.1, Pax-4, o PTF1alfa. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático incluyen células pancreáticas endocrinas, células que expresan la hormona pancreática, y células secretoras de hormona pancreática y células del linaje de células β.

60 "Endodermo definitivo", como se usa aquí se refiere a células que llevan las características de las células derivadas del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células endodérmicas definitivas expresan los siguientes marcadores: HNF-3 beta, GATA-4, SOX-17, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99, y Mixl1.

65

"Endodermo extraembrionario" tal como se utiliza aquí se refiere a una población de células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-7, AFP, y SPARC.

"Marcadores", como se usa en el presente documento, son moléculas de ácido nucleico o polipeptídico que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un aumento del nivel de un marcador positivo y una disminución del nivel de un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de tal manera que la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

"Célula mesendodérmica" tal como se utiliza aquí se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermina (EOMES), SOX-17, DKK4, HNF-3 beta, GSC, FGF17, GATA-6.

"Célula endocrina pancreática", o "célula que expresa hormonas pancreáticas" como se usa en el presente documento se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

"Célula secretora de la hormona pancreática" tal como se utiliza aquí se refiere a una célula capaz de secretar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina, y polipéptido pancreático.

"Células de racha preprimitiva" tal como se utiliza aquí se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Nodal, o FGF8.

"Célula línea primitiva" como se usa aquí se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Brachyury, proteínas homeobox de tipo mezcla, o FGF4

En una realización, la presente descripción proporciona un método para la expansión y diferenciación de células pluripotentes que comprende el tratamiento de las células pluripotentes con un inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B.

En una realización, la presente descripción proporciona un método para expandir y diferenciar células pluripotentes, que comprende las etapas de:

c. El cultivo de células pluripotentes, y

d. El tratamiento de las células pluripotentes con un inhibidor de la actividad enzimática GSK-3B.

En una realización, las células pluripotentes se diferencian en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

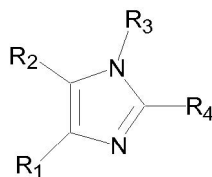
Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, Hnf-3beta, GSC, Cerl, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA-6, CXCR4, C-Kit, CD99, y OTX2. Contemplada en la presente invención es una célula, derivada de una célula pluripotente que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula precursora línea primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula mesendodérmica. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula de endodermo definitivo.

Las células pluripotentes pueden ser tratadas con el inhibidor de la actividad enzimática GSK-3B durante aproximadamente una a aproximadamente 72 horas. Alternativamente, las células pluripotentes pueden ser tratadas con el inhibidor de la actividad enzimática GSK-3B durante aproximadamente 12 a aproximadamente 48 horas. Alternativamente, las células pluripotentes pueden ser tratadas con el inhibidor de la actividad enzimática GSK-3B durante aproximadamente 48 horas.

En una realización, el inhibidor de la actividad enzimática GSK-3B se utiliza a una concentración de aproximadamente 100nM a aproximadamente 100µM. Alternativamente, el inhibidor de la actividad enzimática GSK-3B se utiliza a una concentración de aproximadamente 1µM a aproximadamente 10µM. Alternativamente, el inhibidor de la actividad enzimática GSK-3B se utiliza a una concentración de aproximadamente 10µM.

### **Compuestos adecuados para el uso en los procedimientos descritos en la presente**

En una divulgación, el inhibidor de la enzima GSK-3B es un compuesto de Fórmula (I)



Formula (I)

en el que:

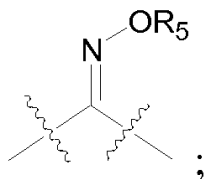
R<sub>1</sub> es fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes de fenilo se seleccionan del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, nitro, trifluorometilo y nitrilo, o pirimidinilo;

R<sub>2</sub> es fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes de fenilo se seleccionan del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno, nitro, trifluorometilo y nitrilo, o pirimidinilo que está opcionalmente sustituido por alquilo C<sub>1-4</sub>, y por lo menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es pirimidinilo.

R<sub>3</sub> es hidrógeno, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, alcoxicarbonilo C<sub>1-5</sub>, ariloxicarbonilo, arilo alquilcarbonilo C<sub>1-5</sub>, arilo alquilo C<sub>1-5</sub>, arilo alquilo C<sub>1-5</sub> sustituido en donde uno o más de los sustituyentes de arilo se seleccionan independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>, halógeno, amino, alquilamino C<sub>1-5</sub>, y di alquilamino C<sub>1-5</sub>, ftalimido alquilo C<sub>1-5</sub>, amino alquilo C<sub>1-5</sub>, diamino alquilo C<sub>1-5</sub>, succinimido alquilo C<sub>1-5</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-5</sub>, arilcarbonilo, alquilcarbonilo C<sub>1-5</sub> alquilo C<sub>1-5</sub> y ariloxicarbonilo alquilo C<sub>1-5</sub>;

R<sub>4</sub> es -(A)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-X;

A es vinileno, etinileno o



R<sub>5</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C<sub>1-5</sub>, fenilo y fenil alquilo C<sub>1-5</sub>;

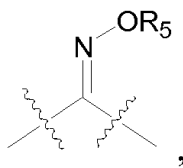
q es 0-9;

X se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, hidroxilo, vinilo, vinilo sustituido en donde uno o más sustituyentes de vinilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de flúor, bromo, cloro y yodo, etinilo, etinilo sustituido en donde los sustituyentes de etinilo se seleccionan del grupo que consiste de flúor, bromo, cloro y yodo, alquilo C<sub>1-5</sub>, alquilo C<sub>1-5</sub> sustituido en donde el uno o más sustituyentes de alquilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alcoxi C<sub>1-5</sub>, trihaloalquilo, ftalimido y amino, cicloalquilo C<sub>3-7</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub> sustituido en donde los sustituyentes de alquilo se seleccionan del grupo que consiste de ftalimido y amino, ftalimidooxi, fenoxi, fenoxi sustituido en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno y alcoxi C<sub>1-5</sub>, fenilo, fenilo sustituido en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno y alcoxi C<sub>1-5</sub>, arilo alquilo C<sub>1-5</sub>, arilo alquilo C<sub>1-5</sub> sustituido en donde el uno o más sustituyentes de arilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno y alcoxi C<sub>1-5</sub>, ariloxi alquilamino C<sub>1-5</sub>, alquilamino C<sub>1-5</sub>, di alquilamino C<sub>1-5</sub>, nitrilo, oxima, benziloxiimino, alquiloxiimino C<sub>1-5</sub>, ftalimido, succinimido, alquilcarboniloxi C<sub>1-5</sub>, fenilcarboniloxi, fenilcarboniloxi sustituido en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se selecciona cada uno del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno y alcoxi C<sub>1-5</sub>, fenilo alquilcarboniloxi C<sub>1-5</sub>, en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, halógeno y alcoxi C<sub>1-5</sub>, aminocarboniloxi, alquilaminocarboniloxi C<sub>1-5</sub>, di alquilaminocarboniloxi C<sub>1-5</sub>, alcoxicarboniloxi C<sub>1-5</sub>, alcoxicarboniloxi C<sub>1-5</sub> sustituido, en donde el uno o más sustituyentes de alquilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de metilo, etilo, isopropilo y hexilo, fenoxicarboniloxi, fenoxicarboniloxi sustituido en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>, y halógeno, alquiltio C<sub>1-5</sub>, alquiltio C<sub>1-5</sub> sustituido en donde los sustituyentes de alquilo se seleccionan del grupo que consiste de hidroxilo y ftalimido, alquilsulfonilo C<sub>1-5</sub>, fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se



seleccionan cada uno del grupo que consiste de bromo, flúor, cloruro, alcoxi C<sub>1-5</sub> y trifluorometilo con la condición de que si A es

5



10

q sea 0 y X sea H, entonces R<sub>3</sub> no puede ser 2-(trimetilsilil)etoximetil; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

15

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que R<sub>1</sub> es fenilo sustituido y R<sub>2</sub> es pirimidin-3-il.

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que R<sub>1</sub> es 4-fluorofenilo

20

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que R<sub>3</sub> es hidrógeno, arilo alquilo C<sub>1-5</sub>, o arilo alquilo C<sub>1-5</sub> sustituido.

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que R<sub>3</sub> es hidrógeno o fenilo alquilo C<sub>1-5</sub>.

25

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que X es succinimido, hidroxil, metilo, fenilo, alquilsulfonilo C<sub>1-5</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, alquilcarboniloxi C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>, fenilcarboniloxi, alquilamino C<sub>1-5</sub>, di alquilamino C<sub>1-5</sub> o nitrilo.

Los compuestos de Fórmula (I) se divulgan en la Patente de Estados Unidos de titularidad compartida N° 6.214.830, la divulgación completa de la cual se incorpora en la presente por referencia.

30

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:

| Compuesto | Nombre |
|-----------|--------|
|-----------|--------|

35

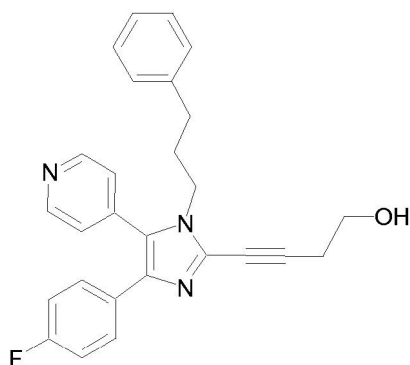
|    |  |
|----|--|
| 1  | 5(4)-(4-fluorofenil)-4(5)-(4-piridil)imidazol,   |
| 2  | 4-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,   |
| 3  | 5-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-4-(4-piridil)imidazol,   |
| 4  | 4-(4-fluorofenil)-2-iodo-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,  |
| 5  | 4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxitubut-1-il)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,                                     |
| 6  | 4-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1-[2-(trimetilsilil)etoximetil]-imidazol,  |
| 7  | 5-(4-fluorofenil)-4-(4-piridil)-1-[2-(trimetilsilil)etoximetil]-imidazol,  |
| 8  | 5-(4-fluorofenil)-2-iodo-4-(4-piridil)-1-[2-(trimetilsilil)etoximetil]-imidazol,                                       |
| 9  | 5-(4-fluorofenil)-4-(4-piridil)-2-(trimetilsilil)etnil-1-[2-(trimetilsilil)etoximetil]-imidazol,                       |
| 10 |  |
| 11 | 2-(2-clorovinil)-5-(4-fluorofenil)-4-(4-piridil)-imidazol,   |
| 12 | 5-(4-fluorofenil)-4-(4-piridil)-1-[2-(trimetilsilil)etoximetil]-imidazol-2-carboxaldehido,                             |
| 13 | 2-[2,2-dibromoetilene-1-il]-5-(4-fluorofenil)-4-(4-piridil)-1-[2-(trimetilsilil)etoximetil]-imidazol-2-carboxaldehido, |
| 14 | 5(4)-(4-fluorofenil)-2-(3-hidroxi-3-fenil-propin-1-il)-4(5)-(4-piridil)imidazol,                                       |
| 15 | 5-(4-fluorofenil)-4-(4-piridil)-1-[2-(trimetilsilil)etoximetil]-2-oximinoimidazol,                                     |
| 16 | 5-(4-fluorofenil)-4-(4-piridil)-2-imidazol oxima,  |
| 17 | 2-(5-cloropentin-1-il)-4-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,                                      |
| 18 | 4-(4-fluorofenil)-2-(4-N-fenilcarbamoiloxibutin-1-il)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,                         |
| 19 | 2-(4-clorobutin-1-il)-4-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol, y                                     |
| 20 | 2-(4-dimetilaminobutin-1-il)-4-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol.                                |

E incluye un compuesto de Fórmula (I) en donde el compuesto es el Compuesto 5 de la fórmula:

5

10

15



Compuesto 5

20

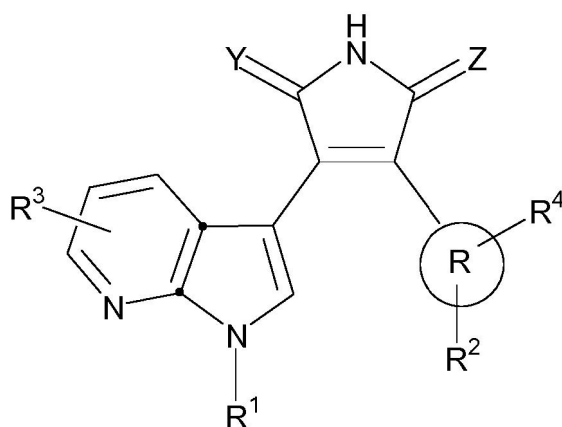
En una divulgación, el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B es un compuesto de Fórmula (II):

25

30

35

40



Formula (II)

en la que:

45

R se selecciona del grupo que consiste de R<sub>a</sub>, alquilo-C<sub>1-8</sub>-R<sub>a</sub>, alqueno-C<sub>2-8</sub>-R<sub>a</sub>, alquino-C<sub>2-8</sub>-R<sub>a</sub> y ciano;

R<sub>a</sub> se selecciona del grupo que consiste de cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo;

50

R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo-C<sub>1-8</sub>-R<sup>5</sup>, alqueno-C<sub>2-8</sub>-R<sup>5</sup>, alquino-C<sub>2-8</sub>-R<sup>5</sup>, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-O-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>), -C(O)-NH(arilo-R<sup>8</sup>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -SO<sub>2</sub>-arilo-R<sup>8</sup>, -cicloalquilo-R<sup>6</sup>, -heterociclilo-R<sup>6</sup>, -arilo-R<sup>6</sup> y -heteroarilo-R<sup>6</sup>; en donde el heterociclilo y el heteroarilo están unidos al átomo de nitrógeno de azaindol en una posición mediante un átomo de carbono del anillo de heterociclilo o heteroarilo;

55

R<sup>5</sup> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-OH, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-NH<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -O-C(O)H, -O-C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -O-C(O)-NH<sub>2</sub>, -OC(O)-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -O-C(O)-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-C(O)H, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-CO<sub>2</sub>H, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-C(O)-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-C(O)-NH<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-C(O)-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-C(O)-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -SH, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-OH, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-NH<sub>2</sub>, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -S-(C<sub>1-</sub>

65

$_{8}$ alquilo-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-N(Alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-NH(Alquilo C<sub>1-8</sub>), -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(Alquilo C<sub>1-8</sub>), -SO<sub>2</sub>-N(Alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -N-R<sup>7</sup>, ciano, (halo)<sub>1-3</sub>, hidroxilo, nitro, oxo, -cicloalquilo-R<sup>6</sup>, -heterociclilo-R<sup>6</sup>, -arilo-R<sup>6</sup> y -heteroarilo-R<sup>6</sup>;

5 R<sup>6</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-8</sub>, alqueno-C<sub>2-8</sub>, alquino-C<sub>2-8</sub>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -C(O)-N(C<sub>1-8</sub>)alquilo<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-N-R<sup>7</sup>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-(halo)<sub>1-3</sub>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-OH, -arilo-R<sup>8</sup>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-arilo-R<sup>8</sup> y -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-heteroarilo-R<sup>8</sup>; con la condición que cuando R<sup>6</sup> esté unido a un átomo de carbono, R<sup>6</sup> se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de alcoxi-C<sub>1-8</sub>, -(C<sub>1-8</sub>)alcoxi-(halo)<sub>1-3</sub>, -SH, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -N-R<sup>7</sup>, ciano, halo, hidroxilo, nitro, oxo y -heteroarilo-R<sup>8</sup>;

15 R<sup>7</sup> es 2 sustituyentes seleccionados independientemente, del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-8</sub>, -alqueno C<sub>2-8</sub>, -alquino C<sub>2-8</sub>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-OH, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, -C(N)-NH<sub>2</sub>, -cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-heterociclilo-R<sup>8</sup>, -arilo-R<sup>8</sup>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-arilo-R<sup>8</sup> y -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-heteroarilo-R<sup>8</sup>;

20 R<sup>8</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno -alquilo C<sub>1-8</sub>, -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-(halo)<sub>1-3</sub> y -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-OH; con la condición de que cuando R<sup>8</sup> está unido a un átomo de carbono, R<sup>8</sup> se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C<sub>1-8</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, ciano, halo, -(C<sub>1-8</sub>)alcoxi-(halo)<sub>1-3</sub>, hidroxilo y nitro;

25 R<sup>9</sup> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alcoxi C<sub>1-8</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, ciano, (halo)<sub>1-3</sub>, hidroxilo y nitro;

30 R<sub>2</sub> es un sustituyente unido a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de -alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>5</sup>, -alqueno C<sub>2-8</sub>-R<sup>5</sup>, -alquino C<sub>2-8</sub>-R<sup>5</sup>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(Alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)-NH(arilo-R<sup>8</sup>), -C(O)-cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heterociclilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heteroarilo-R<sup>8</sup>, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-O-arilo-R<sup>8</sup>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -SO<sub>2</sub>-arilo-R<sup>8</sup>, -cicloalquilo-R<sup>6</sup>, -arilo-R<sup>6</sup> y -(C<sub>1-8</sub>)alquilo-N-R<sup>7</sup>; con la condición de que, cuando R<sub>2</sub> esté unido a un átomo de carbono, R<sub>2</sub> se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C<sub>1-8</sub>-R<sup>5</sup>, -N-R<sup>7</sup>, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, oxo, -heterociclilo-R<sup>6</sup> y -heteroarilo-R<sup>6</sup>;

35 R<sup>3</sup> es 1 a 3 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>10</sup>, -alqueno C<sub>2-8</sub>-R<sup>10</sup>, -alquino C<sub>2-8</sub>-R<sup>10</sup>, -alcoxi C<sub>1-8</sub>-R<sup>10</sup>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)-cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heterociclilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heteroarilo-R<sup>8</sup>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-O-arilo-R<sup>8</sup>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -SO<sub>2</sub>-arilo-R<sup>8</sup>, -N-R<sup>7</sup>, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -heterociclilo-R<sup>8</sup>, -arilo-R<sup>8</sup> y -heteroarilo-R<sup>8</sup>;

40 R<sup>4</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>10</sup>, -alqueno C<sub>2-8</sub>-R<sup>10</sup>, -alquino C<sub>2-8</sub>-R<sup>10</sup>, -alcoxi C<sub>1-8</sub>-R<sup>10</sup>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)-cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heterociclilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heteroarilo-R<sup>8</sup>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-O-arilo-R<sup>8</sup>, -SH, -S-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>10</sup>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -SO<sub>2</sub>-arilo-R<sup>8</sup>, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>), -SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-8</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -N-R<sup>7</sup>, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -heterociclilo-R<sup>8</sup>, -arilo-R<sup>8</sup> y -heteroarilo-R<sup>8</sup>;

45 R<sup>10</sup> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-8</sub>), -N(alquilo C<sub>1-8</sub>)<sub>2</sub>, ciano, (halo)<sub>1-3</sub>, hidroxilo, nitro y oxo; y

50 Y y Z se seleccionan independientemente del grupo que consiste de O, S, (H,OH) y (H,H); con la condición de que uno de Y y Z sea O y el otro se seleccione del grupo que consiste de O, S, (H,OH) y (H,H); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

55 En el presente documento se describen compuestos de Fórmula (II) en donde, R se selecciona del grupo que consiste de R<sub>a</sub>, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sub>a</sub>, -alqueno C<sub>2-4</sub>-R<sub>a</sub>, alquino C<sub>2-4</sub>-R<sub>a</sub>, y ciano.

60 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II), en donde R<sub>a</sub> se selecciona del grupo que consiste de heterociclilo, arilo y heteroarilo.

65 En una divulgación, R<sub>a</sub> se selecciona del grupo que consiste de dihidro-pirano, fenilo, haffilo, tienilo, pirrolo, imidazolilo, pirazolilo, piridinilo, azaindolilo, indazolilo, benzofurilo, benzotienilo, dibenzofurilo y dibenzotienilo.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>5</sup>, -alqueno C<sub>2-4</sub>-R<sup>5</sup>, -alquino C<sub>2-4</sub>-R<sup>5</sup>, -C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-O-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>), -C(O)-NH(arilo-R<sup>8</sup>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -SO<sub>2</sub>-arilo-R<sup>8</sup>, -cicloalquilo-R<sup>6</sup>, -heterociclilo-R<sup>6</sup>, -arilo-R<sup>6</sup> y -heteroarilo-R<sup>6</sup>; en donde el heterociclilo y el heteroarilo están unidos a un átomo de nitrógeno de azaindol en una posición mediante un átomo de carbono del anillo de heterociclilo o heteroarilo.

En una divulgación, R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>5</sup>, -arilo-R<sup>6</sup> y -heteroarilo-R<sup>6</sup>; en donde el heteroarilo está unido a un átomo de nitrógeno de azaindol en una posición mediante un átomo de carbono del anillo de heteroarilo.

En una divulgación, R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>5</sup> y -naftilo-R<sup>6</sup>.

En la presente se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>5</sup> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-OH, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-NH<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-NH(Alquilo C<sub>1-4</sub>), -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-N(Alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -O-C(O)H, -O-C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -O-C(O)-NH<sub>2</sub>, -O-C(O)-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -O-C(O)-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-C(O)H, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-CO<sub>2</sub>H, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-C(O)-NH<sub>2</sub>, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-C(O)-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-C(O)-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -SH, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-OH, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-NH<sub>2</sub>, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -SO<sub>2</sub>-N(Alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -N-R<sup>7</sup>, ciano, (halo)1-3, hidroxilo, nitro, oxo, -cicloalquilo-R<sup>6</sup>, -heterociclilo-R<sup>6</sup>, -arilo-R<sup>6</sup> y -heteroarilo-R<sup>6</sup>.

En una divulgación, R<sub>5</sub> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -N-R<sup>7</sup>, hidroxilo y -heteroarilo-R<sup>6</sup>.

En una divulgación, R<sub>5</sub> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -N-R<sup>7</sup>, hidroxilo, -imidazolilo-R<sup>6</sup>, -triazolilo-R<sup>6</sup> y -tetrazolilo-R<sup>6</sup>.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>6</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -alqueno C<sub>2-4</sub>, -alquino C<sub>2-4</sub>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(Alquilo C<sub>1-4</sub>), -C(O)-N(C<sub>1-4</sub>)alquilo<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-N-R<sup>7</sup>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-(halo)1-3, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-OH, -arilo-R<sup>8</sup>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-arilo-R<sup>8</sup> y -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-heteroarilo-R<sup>8</sup>; con la condición de que, cuando R<sup>6</sup> está unido a un átomo de carbono, R<sup>6</sup> se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C<sub>1-4</sub>, -(C<sub>1-4</sub>)alcoxi-(halo)1-3, -SH, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -N-R<sup>7</sup>, ciano, halo, hidroxilo, nitro, oxo y -heteroarilo-R<sup>8</sup>.

En un ejemplo, R<sup>6</sup> es hidrógeno.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>7</sup> es 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -alqueno C<sub>2-4</sub>, -alquino C<sub>2-4</sub>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-OH, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-NH(Alquilo C<sub>1-4</sub>), -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -C(N)-NH<sub>2</sub>, -cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-heterociclilo-R<sup>8</sup>, -arilo-R<sup>8</sup>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-arilo-R<sup>8</sup> y -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-heteroarilo-R<sup>8</sup>.

En una divulgación R<sup>7</sup> es 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>) y -SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>8</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono o hidrógeno seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-(halo)1-3 y -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-OH, con la condición que, cuando R<sup>8</sup> está unido a un átomo de carbono, R<sup>8</sup> se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C<sub>1-4</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, ciano, halo, -(C<sub>1-4</sub>)alcoxi-(halo)1-3, hidroxilo y nitro.

En un ejemplo, R<sup>8</sup> es hidrógeno.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>9</sup> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alcoxi C<sub>1-4</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -

N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, ciano, (halo)<sub>1-3</sub>, hidroxilo y nitro.

En una divulgación, R<sup>9</sup> es hidrógeno.

5 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>2</sup> es un sustituyente unido a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>5</sup>, -alqueniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>5</sup>, -alquiniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>5</sup>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)-NH(arilo-R<sup>9</sup>), -C(O)-cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heterociclilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heteroarilo-R<sup>8</sup>, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-O-arilo-R<sup>8</sup>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -SO<sub>2</sub>-arilo-R<sup>8</sup>, -cicloalquilo-R<sup>6</sup>, -arilo-R<sup>6</sup> y -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-N-R<sup>7</sup>; con la condición de que, cuando R<sup>2</sup> esté unido a un átomo de carbono, R<sup>2</sup> se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C<sub>1-4</sub>-R<sup>5</sup>, -N-R<sup>7</sup>, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, oxo, -heterociclilo-R<sup>6</sup> y -heteroarilo-R<sup>6</sup>.

15 En una divulgación, R<sub>2</sub> es un sustituyente unido a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>5</sup>, -alqueniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>5</sup>, -alquiniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>5</sup>, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup> -cicloalquilo-R<sub>6</sub>, -arilo-R<sup>6</sup> y -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-N-R<sup>7</sup>; con la condición de que, cuando R<sub>2</sub> esté unido a un átomo de carbono, R<sub>2</sub> se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C<sub>1-4</sub>-R<sup>5</sup>, -N-R<sup>7</sup>, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, oxo, -heterociclilo-R<sup>6</sup> y -heteroarilo-R<sup>6</sup>.

20 En una divulgación, R<sup>2</sup> es un sustituyente unido a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>5</sup> y -arilo-R<sup>6</sup>, con la condición de que, cuando R<sup>2</sup> esté unido a un átomo de nitrógeno, no se forma una sal cuaternaria; y, con la condición de que cuando R<sup>2</sup> esté unido a un átomo de carbono, R<sup>2</sup> se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -N-R<sup>7</sup>, halógeno, hidroxilo y -heteroarilo-R<sup>6</sup>.

25 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>3</sup> es 1 a 3 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alqueniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alquiniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>10</sup>, -C<sub>1-4</sub>alcoxi-R<sup>10</sup>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)-cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heterociclilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heteroarilo-R<sup>8</sup>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-O-arilo-R<sup>8</sup>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -SO<sub>2</sub>-arilo-R<sup>8</sup>, -N-R<sup>7</sup>, -(C<sub>1-4</sub>)alquilo-N-R<sup>7</sup>, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -heterociclilo-R<sup>8</sup>, -arilo-R<sup>8</sup> y -heteroarilo-R<sup>8</sup>.

30 En una divulgación, R<sup>3</sup> es un sustituyente unido a un átomo de carbono seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alqueniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alquiniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>10</sup>, -C<sub>1-4</sub>alcoxi-R<sup>10</sup>, -C(O)H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, ciano, halógeno, hidroxilo, y nitro.

35 En una divulgación R<sup>3</sup> es un sustituyente unido a un átomo de carbono seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, halógeno e hidroxilo.

40 En el presente documentos se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>4</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alqueniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alquiniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alcoxi C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -C(O)H, -C(O)-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-NH<sub>2</sub>, -C(O)-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>), -C(O)-N(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)-cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heterociclilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-arilo-R<sup>8</sup>, -C(O)-heteroarilo-R<sup>8</sup>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)-O-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -C(O)-O-arilo-R<sup>8</sup>, -SH, -S-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>10</sup>, -SO<sub>2</sub>-(C<sub>1-4</sub>)alquilo-R<sup>9</sup>, -SO<sub>2</sub>-arilo-R<sup>8</sup>, -SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>), -SO<sub>2</sub>-N(alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -N-R<sup>7</sup>, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo-R<sup>8</sup>, -heterociclilo-R<sup>8</sup>, -arilo-R<sup>8</sup> y -heteroarilo-R<sup>8</sup>.

45 En una divulgación, R<sup>4</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alqueniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alquiniolo C<sub>2-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alcoxi C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -C(O)H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo, -heterociclilo, -arilo y -heteroarilo.

50 En una divulgación, R<sup>4</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alcoxi C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, halógeno e hidroxilo.

55 En una divulgación, R<sup>4</sup> es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -alcoxi C<sub>1-4</sub>-R<sup>10</sup>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, cloro, flúor e hidroxilo.

60 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R<sup>10</sup> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-4</sub>), -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, ciano, (halo)<sub>1-3</sub>, hidroxilo, nitro y oxo.

65 En una divulgación, R<sup>10</sup> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y, (halo)<sub>1-3</sub>.

En una divulgación, R<sup>10</sup> es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y , (fluoro)<sub>3</sub>.

5 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, Y y Z se seleccionan independientemente del grupo que consiste de O, S, (H,OH) y (H,H); con la condición de que uno de Y y Z sea O y el otro se seleccione del grupo que consiste de O, S, (H,OH) y (H,H).

10 En una divulgación, Y y Z se seleccionan independientemente del grupo que consiste de O y (H,H); con la condición de que uno de Y y Z sea O, y el otro se seleccione del grupo que consiste de O y (H,H).

En una divulgación, Y y Z se seleccionan independientemente de O.

Los compuestos de Fórmula (II) se divulgan en la Patente de Estados Unidos de titularidad compartida N° 7.125.878.

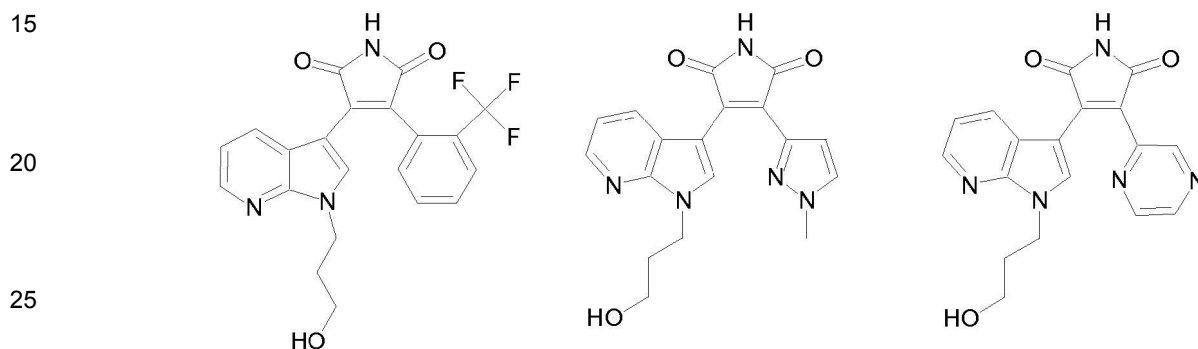
15 La divulgación del presente documento incluye un compuesto de Fórmula (II) en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:

| Compuesto | Nombre   |
|-----------|--|
| 20        | 1. 3-(2-clorofenil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>2. 3-(2-clorofenil)-4-[1-[3-(dimetilamino)propil]-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>3. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1-naftalenil)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>4. 3-[1-[3-(dimetilamino)propil]-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1-naftalenil)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>5. 3-(5-clorobenzo[ <i>b</i> ]tien-3-il)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>25 6. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1H-indazol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>7. 3-(1-etil-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>8. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>9. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(3-metoxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>30 10. 3-(2-cloro-4-fluorofenil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>11. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>12. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(2-piridinil)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>13. 3-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridinil]-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>35 14. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(2-tienil)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>15. 3-(2,5-dicloro-3-tienil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>16. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirazol-3-il]-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>17. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1H-imidazol-2-il)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>40 18. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-imidazol-4-il]-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>19. 3-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-imidazol-4-il]-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>20. 3-[1-[3-(dimetilamino)propil]-1H-indazol-3-il]-4-[1-(2-naftalenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>45 21. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-indazol-3-il]-4-[1-(2-naftalenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>22. 3-[( <i>E</i> )-2-(4-fluorofenil)etenil]-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>23. 3-(3,4-dihidro-2H-piran-6-il)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>50 24. 4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-[3,3'-bi-1H-pirrol]-2,5-diona,<br>25. 3-(2-benzofuranil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>26. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>27. 2,5-dihidro-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-carbonitrilo,<br>28. 3-dibenzo[ <i>b</i> , <i>d</i> ]tien-4-il-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>55 29. 3-(4-dibenzofuranil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>30. 3-(2-hidroxifenil)-4-[1-(3-metoxipropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>31. 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-[1-(3-metoxipropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>32. 3-(3,4-dihidroxifenil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>33. 3-(2-metoxifenil)-4-[1-(2-naftalenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,<br>60 34. 2-metilpropil éster de ácido[3-[3-[2,5-dihidro-4-(2-metoxifenil)-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il]-1H-pirrol[2,3-b]piridin-1-il]propil]-carbámico,<br>35. 3-[1-(3-aminopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona,<br>36. N-[3-[3-[2,5-dihidro-4-(2-metoxifenil)-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il]-1H-pirrol[2,3-b]piridin-1-il]propil]-acetamida,<br>65 37. N-[3-[3-[2,5-dihidro-4-(2-metoxifenil)-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il]-1H-pirrol[2,3-b]piridin-1-il]propil]- |

sulfamida,

38. 3-(2-metoxifenil)-4-[1-[3-(1H-tetrazol-1-il)propil]-1H-pirrol-2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,  
 39. 3-(2-metoxifenil)-4-[1-[3-(2H-tetrazol-2-il)propil]-1H-pirrol-2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5- diona,  
 40. 3-[1-(3-hidroxi-propil)-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-il]-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona,  
 5 41. 3-(2,4-dimetoxi-pirimidin-5-il)-4-[1-(3-hidroxi-propil)-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-il]-pirrol-2,5- diona,  
 42. 4-{3-[4-(2,4-dimetoxi-pirimidin-5-il)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]-pirrol-2,3-b]piridin-1-il}-  
 butironitrilo,  
 43. 4-{3-[4-(1-metil-1H-pirazol-3-il)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]-pirrol-2,3-b]piridin-1-il}-  
 butironitrile, y  
 10 44. 3-(2,4-dimetoxi-pirimidin-5-il)-4-(1-fenetil-1H-pirrol-2,3-b]piridina-3-il)-pirrol-2,5-diona.

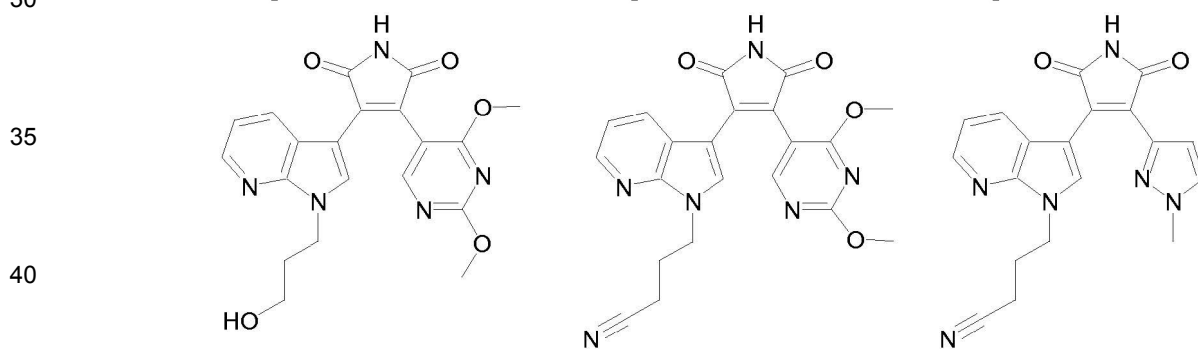
En el presente documento se divulga un compuesto de Fórmula (II) en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de :



Compuesto 11

Compuesto 26

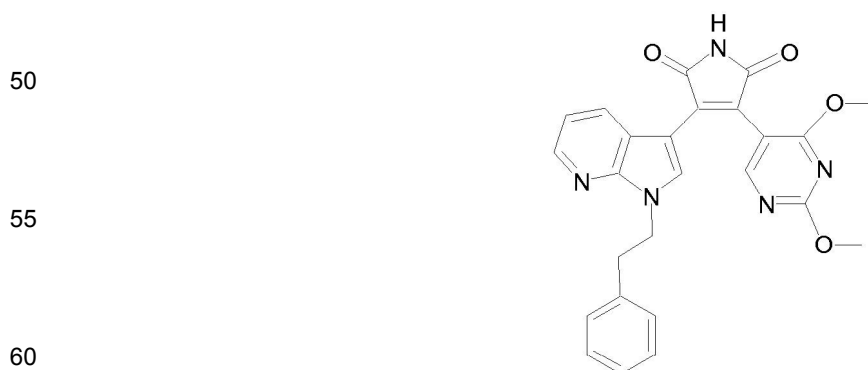
Compuesto 40



Compuesto 41

Compuesto 42

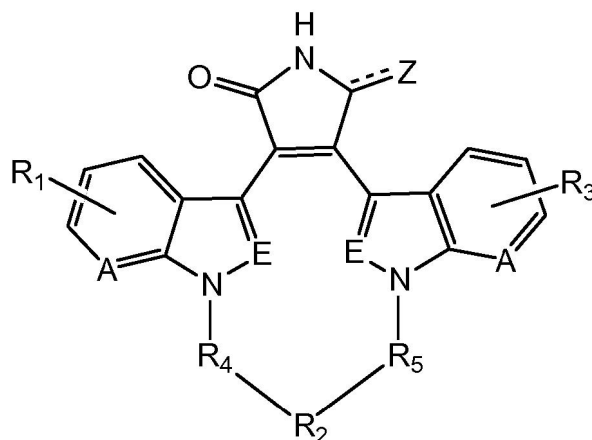
Compuesto 43



Compuesto 44

65

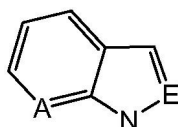
En una realización, el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B es un compuesto de Fórmula (III):



Formula (III)

en donde

A y E se seleccionan independientemente del grupo que consiste de un átomo de carbono sustituido con hidrógeno y un átomo de nitrógeno; en donde



se selecciona independientemente del grupo que consiste de 1*H*-indol, 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina, 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina y 1*H*-indazol;

Z se selecciona de O, alternativamente, Z se selecciona de dihidro, en donde cada átomo de de hidrógeno está unido por un enlace sencillo;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de alquilo C<sub>1-8</sub>, alquenilo C<sub>2-8</sub> y alquinilo C<sub>2-8</sub> opcionalmente sustituidos con oxo;

R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste de -alquilo C<sub>1-8</sub>, -alquenilo C<sub>1-8</sub>, -alquinilo C<sub>1-8</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-O-, -O-(C<sub>2-8</sub>)alquenil-O-, -O-(C<sub>2-8</sub>)alquinil-O-, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquil-C(O)- (en donde cualquiera de los grupos de ligamiento alquilo, alquenilo y alquinilo precedentes son cadenas de carbono lineales opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -alquilo C<sub>1-8</sub>--C(O)O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxil, hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo y oxo; y, en donde cualquiera de los grupos de ligamiento alquilo, alquenilo y alquinilo precedentes está opcionalmente sustituidos con de uno a dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de heterociclilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, arilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heteroarilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, espirocicloalquilo y espiroheterociclilo (en donde cualquiera de los sustituyentes de cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxil e hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde cualquiera de los sustituyentes de heterociclilo precedentes está opcionalmente sustituido con oxo), cicloalquilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo (en donde el cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente

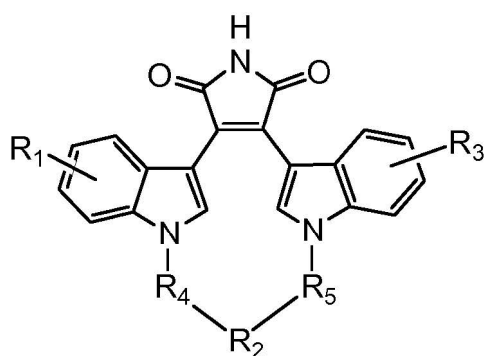


seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con oxo), -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O<sup>-5</sup>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O<sup>-5</sup>-NR<sub>6</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O<sup>-5</sup>-S-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -NR<sub>6</sub>-, -NR<sub>6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>8</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(O)-, -C(O)-NR<sub>6</sub>-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-C(O)-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(O)-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(NR<sub>7</sub>)-NR<sub>8</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>- y -SO<sub>2</sub> (en donde R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heterocicilil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, arilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo y heteroarilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde los sustituyentes de heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con oxo)); con la condición de que, si A y E se seleccionan de un átomo de carbono sustituido con hidrógeno, entonces R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste de -alquinilo C<sub>2-8</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquil-O-, -O-(C<sub>2-8</sub>)alquenil-O-, -O-(C<sub>2-8</sub>)alquinil-O-, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquil-C(O)- (en donde cualquiera de los grupos de ligamiento alquilo, alquenilo y alquinilo precedentes son cadenas de carbono lineales sustituidas opcionalmente con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -alquilo C<sub>1-8</sub>-C(O)O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi, hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo y oxo; y, en donde cualquiera de los grupos de ligamiento alquilo, alquenilo y alquinilo precedentes está opcionalmente sustituidos con de uno a dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de heterociclilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, arilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heteroarilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, espirocicloalquilo y espiroheterociclilo(en donde cualquiera de los sustituyentes de cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O<sup>-5</sup>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O<sup>-5</sup>-NR<sub>6</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O<sup>-5</sup>-S-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -NR<sub>6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>8</sub>-, -NR<sub>9</sub>-C(O)-, -C(O)-NR<sub>9</sub>-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-C(O)-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(O)-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(NR<sub>7</sub>)-NR<sub>8</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>O-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S- y -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>- (en donde R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heterocicilil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, aril(C<sub>1-8</sub>)alquilo y heteroaril(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde los sustituyentes de heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo consistente de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con oxo); y, en donde R<sub>9</sub> se selecciona del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heterocicilil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, aril(C<sub>1-8</sub>)alquilo y heteroaril(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde los sustituyentes

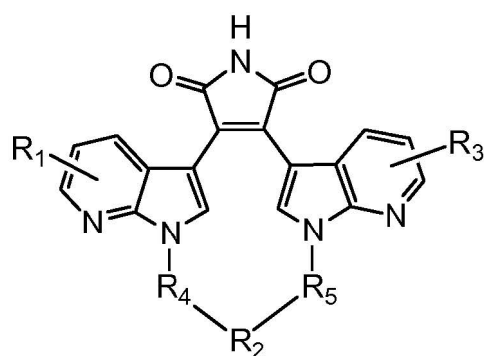
de heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes ests sustituidos opcionalmente con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxil e hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con oxo)); y,

R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C<sub>1-8</sub>, alquenilo C<sub>2-8</sub>, alquinilo C<sub>2-8</sub> (en donde el alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), (halo)<sub>1-3</sub>, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxil, hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo y oxo), alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxycarbonilo C<sub>1-8</sub>, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, alquiltio C<sub>1-8</sub>, arilo, heteroarilo (en donde el arilo y el heteroarilo están opcionalmente sustituidos con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxil e hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), ciano, halógeno, hidroxil y nitro; y sales farmacticamente aceptables de los mismos.

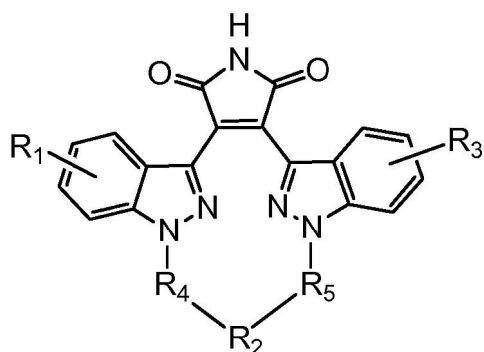
En una realización, un compuesto de fórmula (III) es un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



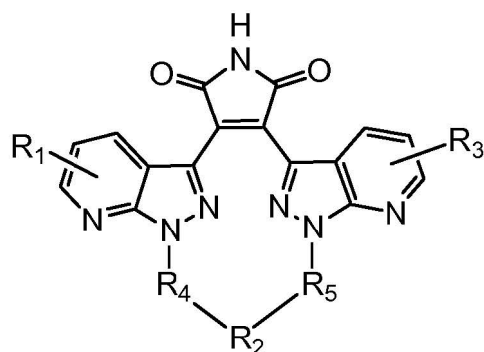
Formula (IIIa)



Formula (IIIb)

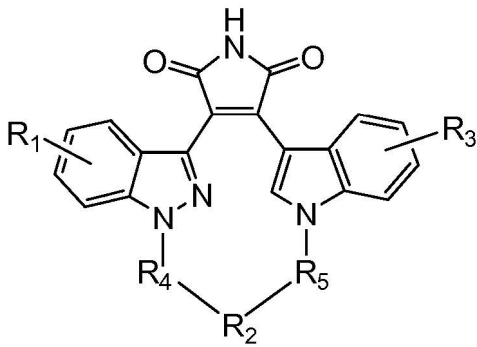


Formula (IIIc)

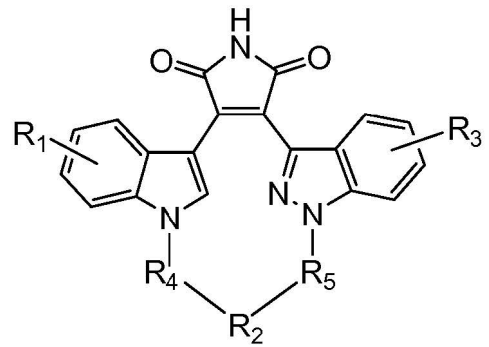


Formula (IIIId)

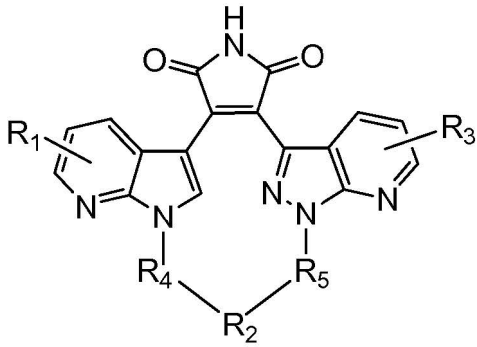
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



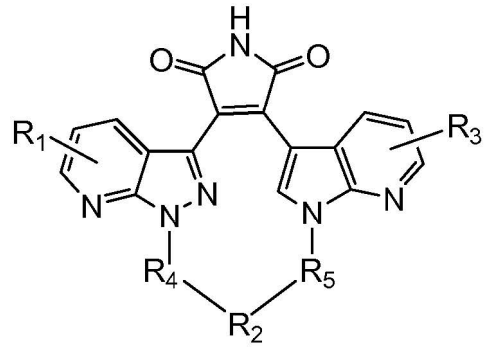
Formula (IIIe)



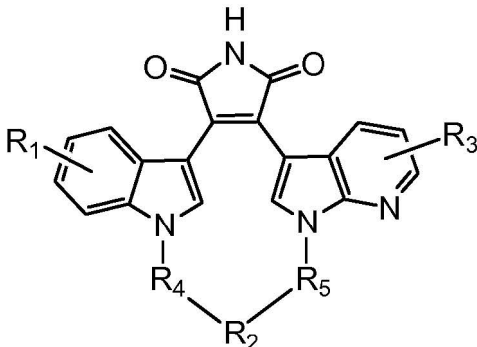
Formula (IIIf)



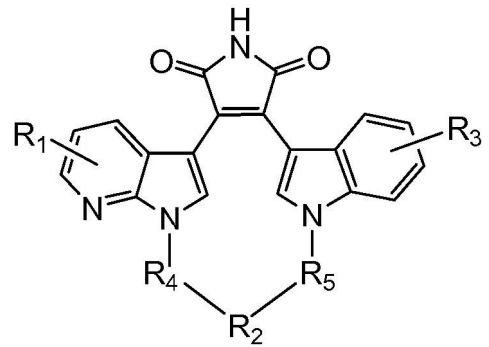
Formula (IIIg)



Formula (IIIh)

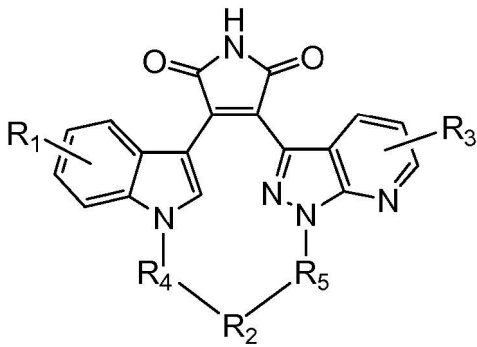


Formula (IIIi)



Formula (IIIj)

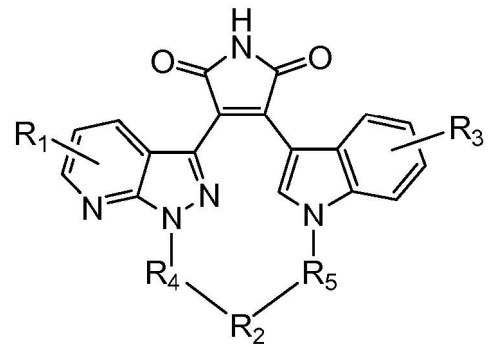
5



10

15

Formula (IIIk)

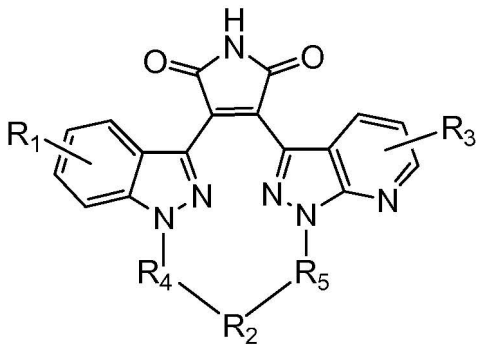


Formula (IIIi)

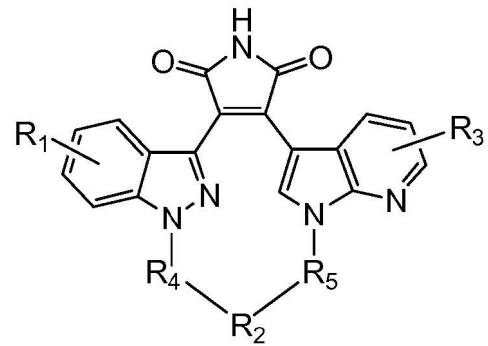
20

25

30



Formula (IIIm)



Formula (IIIn)

35

en donde todas las variables son como se han definido anteriormente; y, sales farmacéuticamente aceptables de las mismas

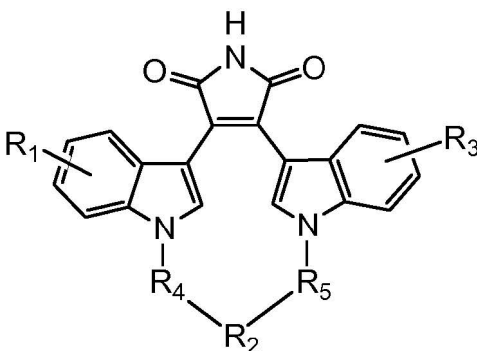
40

En una realización, un compuesto de Fórmula (III) es un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:

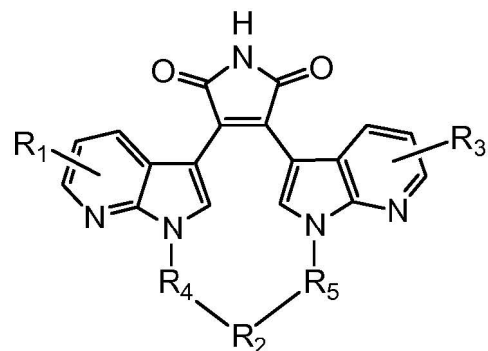
45

50

55



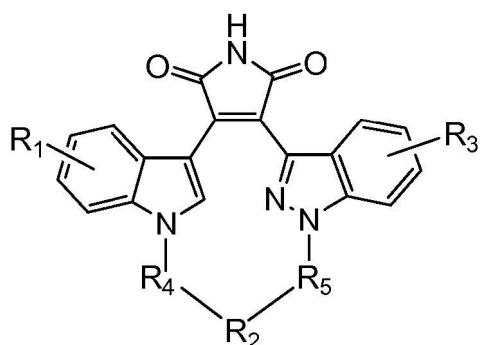
Formula (IIIa)



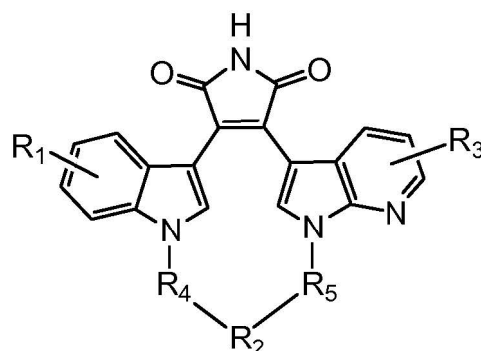
Formula (IIIb)

60

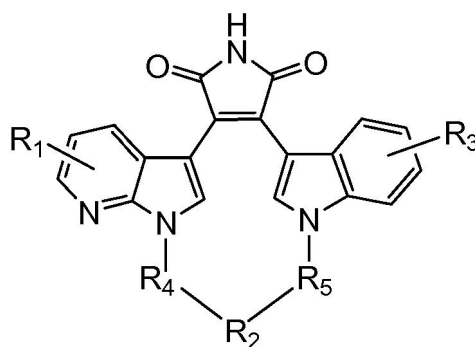
65



Formula (III f)



Formula (III i)



Formula (III j)

en donde todas las variables son como se han definido anteriormente; y, sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

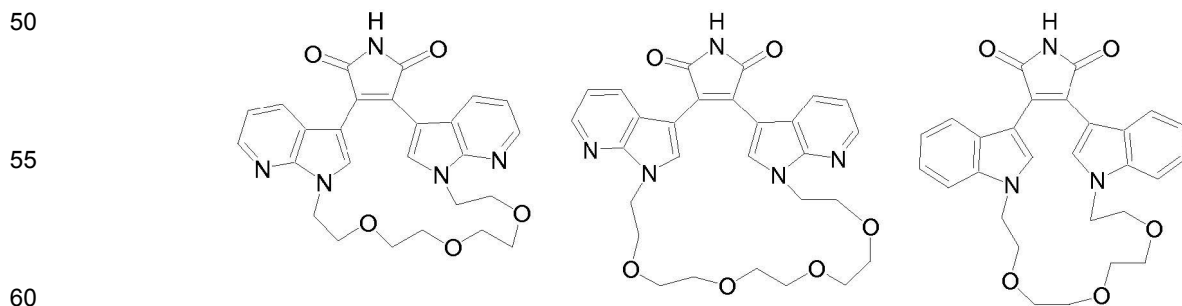
Los compuestos de Fórmula (III) se divulgan en la Patente de Estados Unidos de titularidad compartida N° 6.828.327, la divulgación completa de la cual se incorpora en la presente por referencia.

Un ejemplo de la invención incluye un compuesto de Fórmula (III) en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:

| Compuesto | Nombre   |
|-----------|--|
| 1.        | 6,7,9,10,12,13,15,16-octahidro-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H-dipirido[2,3- <i>k</i> :3',2'- <i>q</i> ]pirrolo[3,4- <i>n</i> ][1,4,7,10,19]trioxadiazaciclohenicosina-23,25(24H)-diona,                  |
| 2.        | 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23-decahidro-9,4:24,29-dimeteno-1H-dipirido[2,3- <i>n</i> :3',2'- <i>f</i> ]pirrolo [3,4- <i>q</i> ][1,4,7,10,13,22]tetraoxadiazacicotetracosina-1,3(2H)-diona,           |
| 3.        | 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23,25,26-dodecahidro-9,4:27,32-dimeteno-1Hdipirido[2,3- <i>q</i> :3',2'- <i>w</i> ]pirrolo[3,4- <i>f</i> ][1,4,7,10,13,16,25]pentaoxadiazacicloheptacosina-1,3(2H)-diona, |
| 4.        | 6,7,9,10,12,13-hexahidro-20H-5,23:14,19-dimeteno-5H-dibenzo[ <i>h,n</i> ]pirrolo[3,4- <i>k</i> ][1,4,7,16]dioxadiazaciclooctadecine-20,22(21H)-diona,  |
| 5.        | 6,7,9,10,12,13,15,16-octahidro-23H5,26:17,22-dimeteno-5H dibenzo[ <i>k,q</i> ]pirrolo[3,4- <i>n</i> ][1,4,7,10,19]trioxadiazaciclohenicosina-23,25(24H)-diona,                                       |
| 6.        | 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23-decahidro-9,4:24,29-dimeteno-1H-dibenzo[ <i>n,t</i> ]pirrolo[3,4- <i>q</i> ][1,4,7,10,13,22]tetraoxadiazacicotetracosina-1,3(2H)-diona,                                |
| 7.        | 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23,25,26-dodecahidro-9,4:27,32-dimeteno-1H-dibenzo[ <i>q,w</i> ]pirrolo [3,4- <i>f</i> ][1,4,7,10,13,16,25]pentaoxadiazacicloheptacosina-1,3(2H)-diona,                   |
| 8.        | 12-hidro-6H,19H-5,22:13,18:7,11-trimetenopirido[2,3- <i>j</i> ]pirrolo[3,4- <i>m</i> ][1,9]benzodiazacicloheptadecine-19,21(20H)-diona,  |
| 9.        | 12-hidro-6H,19H-5,22:13,18-dimeteno-7,11-nitrilopirido[2,3- <i>j</i> ]pirrolo[3,4- <i>m</i> ][1,9]benzodiazacicloheptadecine-19,21(20H)-diona,   |

10. 6,7,9,10,12,13-hexahidro-20H-5,23:14,19-dimeteno-5H-pirido[2,3-*k*]pirrolo[3,4-*n*][4,7,1,10] benzodioxadiazaciclooctadecina-20,22(21H)-diona,
11. 6,7,9,10,12,13,15,16-octahidro-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H-pirido[2,3-*n*]pirrolo[3,4-*q*][4,7,10,1,13]benzotrioxadiazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
- 5 12. 11-etil-6,7,10,11,12,13,15,16-octahidro-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H,9H-dibenzo[*k,q*]pirrolo [3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
13. 6,7,10,11,12,13,15,16-octahidro-11-metil-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H,9H-dibenzo[*k,q*]pirrolo [3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
14. 6,7,10,11,12,13,15,16-octahidro-11-(1-metiletil)-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H,9H-dibenzo[*k,q*]pirrolo[3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
- 10 15. 7,8,9,10,11,12,13,14,15,16-decahidro-8,11,14-trimetil-6H,23H-5,26:17,22-dimetenedibenzo[*n,f*]pirrolo[3,4-*q*][1,4,7,10,13]pentaazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
16. 6,7,10,11,12,13,15,16-octahidro-11-metil-23H-5,26-meteno-17,22-nitrilo-5H,9H-dibenzo[*k,q*]pirrolo[3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
- 15 17. 11-etil-6,7,10,11,12,13,15,16-octahidro-23H-5,26-meteno-17,22-nitrilo-5H,9H-dibenzo[*k,q*]pirrolo[3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
18. 11-etil-6,7,10,11,12,13,15,16-octahidro-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H,9H-dipirido[2,3-*k*:3',2'-*q*]pirrolo[3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
19. 6,7,9,10,12,13,15,16-octahidro-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H-dipirido[2,3-*k*:3',2'-*q*]pirrolo[3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
- 20 20. 7,8,9,10,11,12,13,14,15,16-decahidro-(6H,23H-5,26:17,22-dimetenedipirido[2,3-*n*:3',2'-*f*]pirrolo [3,4-*q*][1,7,13]triazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
21. 11-etil-7,8,9,10,11,12,13,14,15,16-decahidro-6H,23H-5,26:17,22-dimetenedipirido[2,3-*n*:3',2'-*f*]pirrolo[3,4-*q*][1,7,13]triazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
- 25 22. 6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-decahidro-22H-5,25:16,21-dimeteno-5H-dipirido[2,3-*m*:3',2'-*s*]pirrolo [3,4-*p*][1,6,12]triazacicloheicosina-22,24(23H)-diona,
23. 10-etil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-decahidro-22H-5,25:16,21-dimeteno-5H-dipirido[2,3-*m*:3',2'-*s*]pirrolo[3,4-*p*][1,6,12]triazacicloheicosina-22,24(23H)-diona,
24. 7,8,9,15,16,17,18-heptahidro-6H,25H-5,28:19,24-dimeteno-10,14-nitridodipirido[2,3-*b*:3',2'-*h*]pirrolo[3,4-*e*][1,10]diazacicloheicosina-25,27(26H)-diona,
- 30 25. 7,8,9,10,11,13,14,15,16-nonahidro-6H,23H-5,26:17,22-dimetenedipirido[2,3-*b*:3',2'-*h*]pirrolo[3,4-*e*][1,10]diazacicloheicosina-12,23,25(24H)-trione,
26. 7,8,9,11,12,13,14-heptahidro-6H,21H-5,24:15,20-dimetenedipirido[2,3-*b*:3',2'-*h*]pirrolo[3,4-*e*][1,10]diazacicloheicosina-10,21,23(22H)-trione,
- 35 27. 6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-decahidro-7,14-dihidroxi-(7R,14R)-22H-5,25:16,21-dimeteno-5H-dipirido[2,3-*b*:3',2'-*h*]pirrolo[3,4-*e*][1,10]diazacicloheicosina-22,24(23H)-diona,
28. 6,7,9,10,12,13-hexahidro-20H-5,23:14,19-dimeteno-5H-dipirido[2,3-*h*:3',2'-*n*]pirrolo[3,4-*k*][1,4,7,16]dioxadiazaciclooctadecina-20,22(21H)-diona,
29. 6,7,10,11,12,13,15,16-octahidro-11-(2-metoxietil)-23H-5,26-meteno-17,22-nitrilo-5H,9H-dibenzo[*k,q*]pirrolo[3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,
- 40 30. 6,7,10,11,12,13,15,16-octahidro-11-(2-hidroxietil)-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H,9H-dibenzo[*k,q*]pirrolo[3,4-*n*][1,7,4,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona, and
31. 6,7,9,10,12,13,14,15,16,17-decahidro-14-metil-24H-5,27:18,23-dimeteno-5H-dibenzo[*l,r*]pirrolo [3,4-*o*][1,4,7,11,20]dioxatriazacicloheicosina-24,26(25H)-diona.
- 45

Un ejemplo de la invención incluye un compuesto de Fórmula (III) en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:

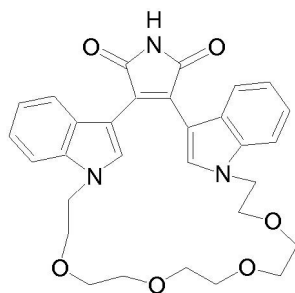


Compuesto 1

Compuesto 2

Compuesto 5

65



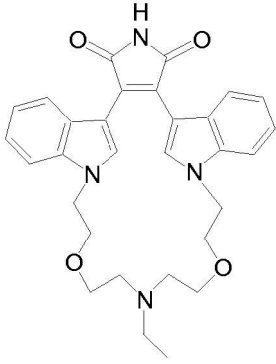
Compuesto 6

Otros ejemplos de la invención incluyen un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:

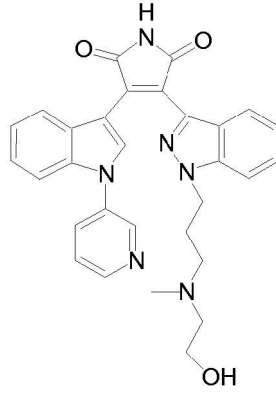
| Compuesto | Nombre   |
|-----------|--|
| 1a        | A ser proporcionado  |
| 2a        | 3-[1-[3-[(2-hidroxi-etil)metilamino]propil]-1H-indazol-3-il]-4-[1-(3-piridinil)-1H-indol-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,  |
| 3a        | 3,5-dicloro-N-[3-cloro-4-[(3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]tiazino[3,4-c][1,4]benzodiazepin-11-il)carbonil]fenil]-benzamida,   |
| 5a        | 3-(2-metoxi-fenil)-4-(1-piridin-3-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona,  |
| 6a        | 6-[[2-[4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)-2-pirimidinil]amino]etil]amino]-3-piridinecarbonitrilo,   |
| 7a        | 3-(5-cloro-1-metil-1H-indol-3-il)-4-[1-(3-imidazol-1-il-propil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona,   |
| 8a        | 3-(5-cloro-1-metil-1H-indol-3-il)-4-[1-(3-[1,2,3]triazol-1-il-propil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona,   |
| 9a        | 3-[1-(3-hidroxi-propil)-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-3-il)-pirrol-2,5-diona,  |
| 10a       | A ser proporcionado  |
| 11a       | 3-[1-(3-hidroxi-3-metil-butil)-1H-indazol-3-il]-4-(1-piridin-3-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona,   |
| 12a       | 3-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indazol-3-il]-4-(1-pirimidin-5-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona,  |
| 13a       | 3-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indol-3-il]-4-(1-pirimidin-5-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona,  |
| 14a       | (11Z)-8,9,10,13,14,15-hexahidro-2,6:17,21-di(meteno)pirrolo[3,4-h][1,15,7]dioxazaciclotricosina-22,24(1H,23H)-diona,   |
| 15a       | 3-(5-cloro-1-piridin-3-il-1H-indol-3-il)-4-[1-(3-hidroxi-propil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona,  |
| 16a       | 3-(2-metoxi-fenil)-4-[1-(3-metoxi-propil)-1H-pirrol-3,2-c]piridin-3-il]-pirrol-2,5-diona,  |
| 17a       | 3-[1-(3-hidroxi-propil)-1H-indazol-3-il]-4-[1-(tetrahidro-piran-4-il)-1H-indol-3-il]-pirrol-2,5-diona,   |
| 18a       | 2-{3-[4-(5-cloro-1-metil-1H-indol-3-il)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]-indazol-1-il}-N-(2-hidroxi-etil)-acetamida,  |
| 19a       | 4-(3-cloro-fenil)-6-(3-dimetilamino-propil)-5,6-dihidro-4H-2,4,6-triaza-ciclopenta[c]fluorme-1,3-diona,  |
| 20a       | 14-etil-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-dimeteno-dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,                        |
| 21a       | 14-benzil-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,                     |
| 22a       | 3-(1-[2-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-etil]-1H-indol-3-il)-4-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indol-3-il]-pirrol-2,5-diona,  |
| 23a       | 6,7,8,9,10,11,12,13-octahidro-8,11-dimetil-5,23:14,19-dimeteno-20H-dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10]tetraazaciclooctadecina-20,22(21H)-diona,                             |
| 24a       | 7,8,9,10,12,13,16,17,18,19-decahidro-8,17-dimetil-15H,26H-5,29:20,25-dimeteno-6H-dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19,22]dioxatetraazaciclotetracosina-26,28(27H)-diona,   |
| 25a       | 14-(2-furilmetil)-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,             |
| 26a       | 14-(2-tienilmetil)-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,            |
| 27a       | 14-(1-naftilmetil)-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,            |
| 28a       | 14-(piridin-4-ilmetil)-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona,        |
| 29a       | 3-[1-(2-[2-(1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-ilamino)-etoxi]-etoxi)-etil]-1H-indol-3-il]-4-[1-(2-(1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-ilamino)-etil)-1H-indol-3-il]-pirrol-2,5-diona, |
| 30a       | 3-[1-(3-dimetilamino-fenil)-1H-indol-3-il]-4-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona,  |
| 31a       | 3-[5-cloro-1-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1H-indol-3-il]-4-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-   |

32a diona, y  
 éster metílico de ácido 5-(5-cloro-3-[4-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indazol-3-il]-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]-indol-1-il)-nicotínico.

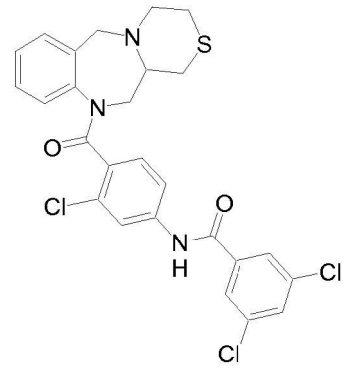
5 Otros ejemplos de la invención incluyen un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



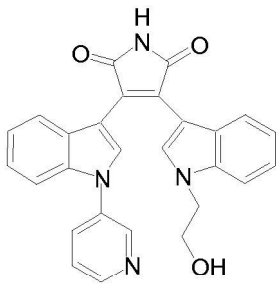
Compuesto 1a



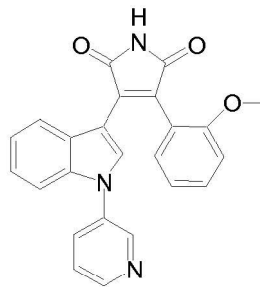
Compuesto 2a



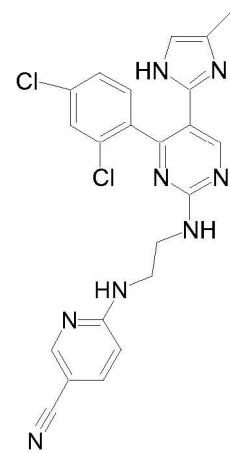
Compuesto 3a



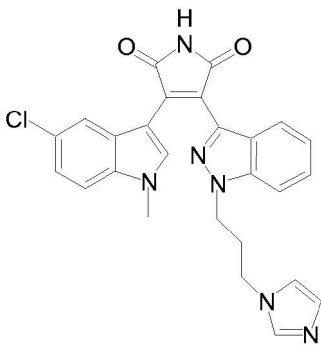
Compuesto 4a



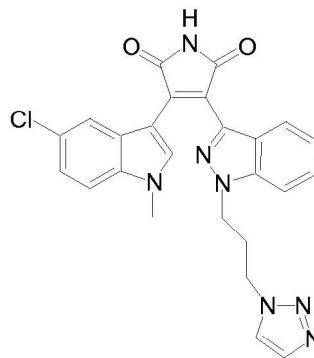
Compuesto 5a



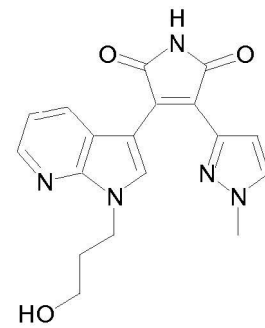
Compuesto 6a



Compuesto 7a

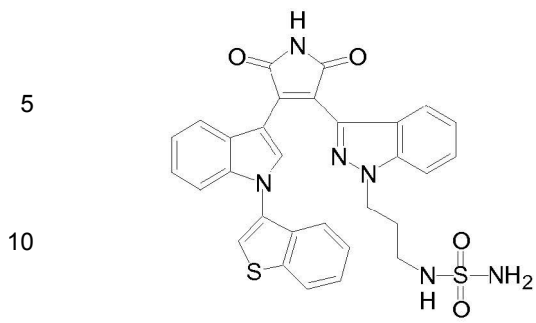


Compuesto 8a

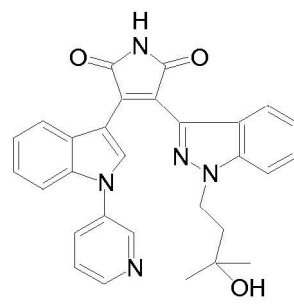


Compuesto 9a

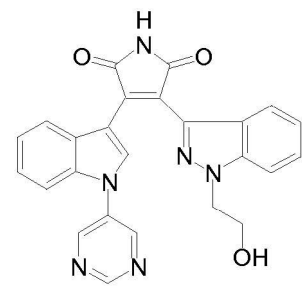




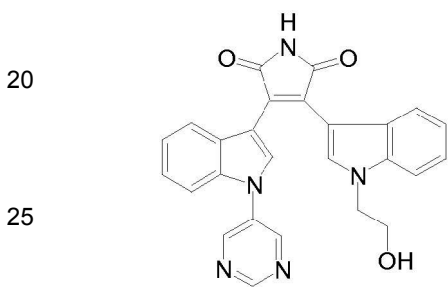
Compuesto 10a



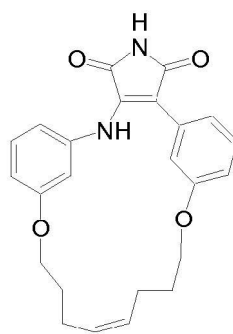
Compuesto 11a



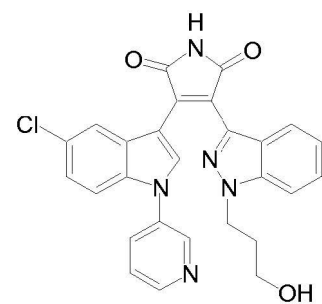
Compuesto 12a



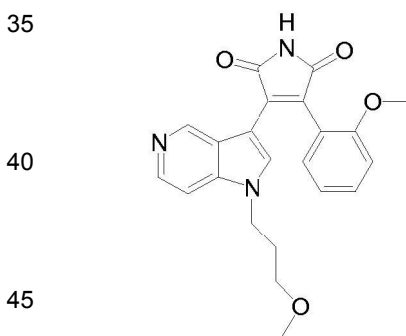
Compuesto 13a



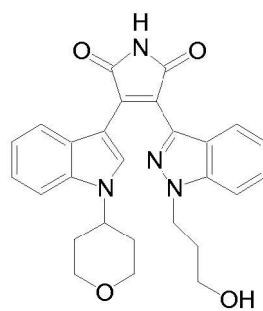
Compuesto 14a



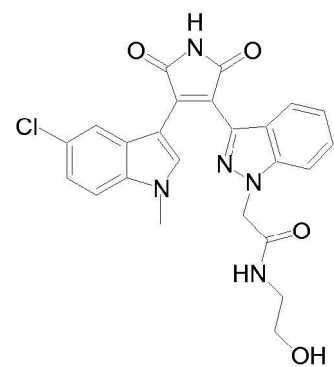
Compuesto 15a



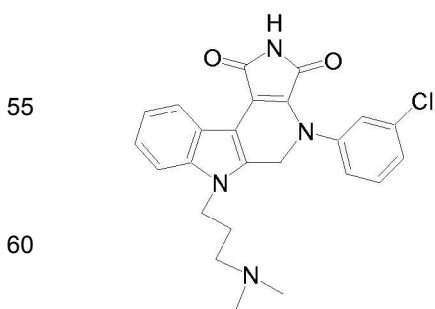
Compuesto 16a



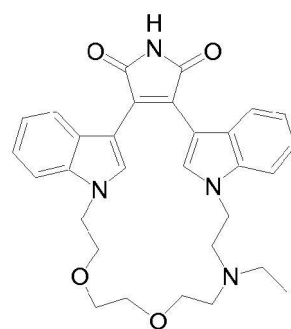
Compuesto 17a



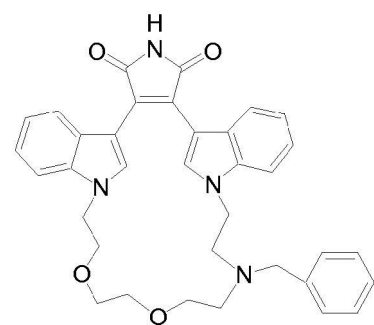
Compuesto 18a



Compuesto 19a



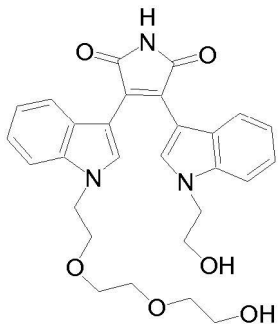
Compuesto 20a



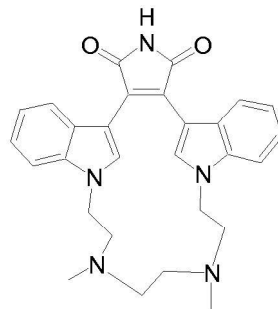
Compuesto 21a

65

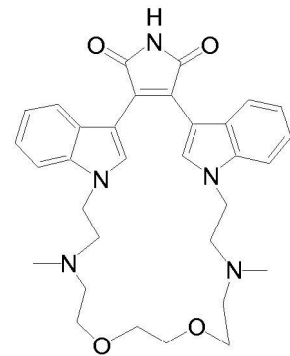
5



Compuesto 22a



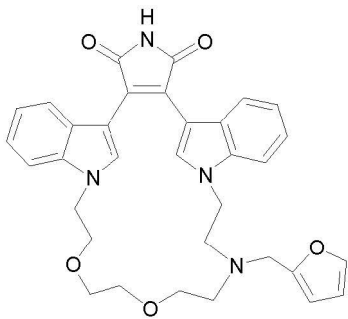
Compuesto 23a



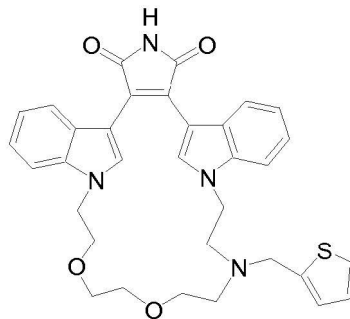
Compuesto 24a

10

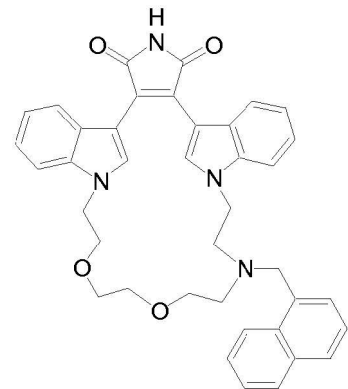
15



Compuesto 25a



Compuesto 26a



Compuesto 27a

20

25

30

35

40

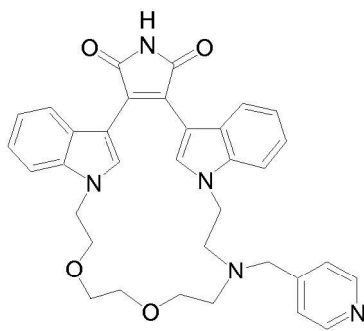
45

50

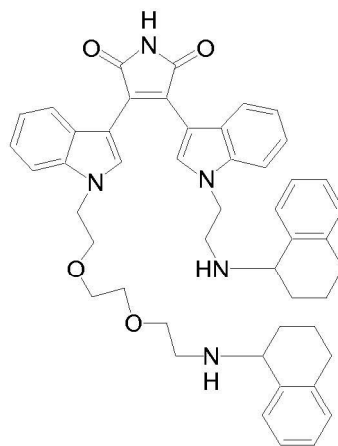
55

60

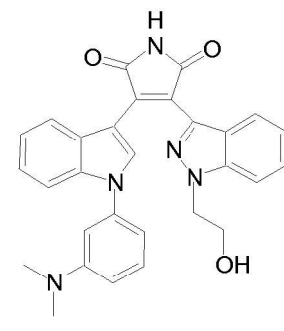
65



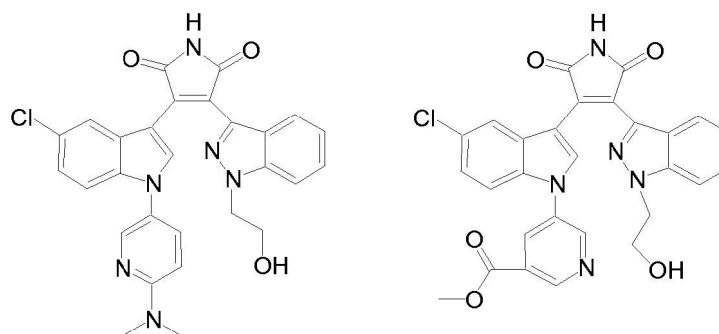
Compuesto 28a



Compuesto 29a



Compuesto 30a



Compuesto 31a

Compuesto 32a

### Células adecuadas para el tratamiento

Las células pluripotentes, adecuadas para uso en la presente invención expresan al menos uno de los siguientes marcadores de pluripotencia seleccionados del grupo que consiste en ABCG2, cripto, FoxD3, conexina43, conexina45, Oct4, SOX-2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tral-60 y Tral-81.

En una realización, las células pluripotentes son las células madre embrionarias. En una realización alternativa, las células pluripotentes son las células que expresan marcadores de pluripotencia derivados de células madre embrionarias. En una realización, las células madre embrionarias son humanas.

### Aislamiento, expansión y cultivo de células madre embrionarias humanas

*Caracterización de células madre embrionarias:* Células madre de embriones humanos pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios de etapa específica (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando los anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81-(Thomson *et al.*, Science 282:1145, 1998). La diferenciación de células madre embrionarias humanas en los resultados *in vitro* en la pérdida de expresión SSEA-4, Tra-1-60, y Tra-1-81 (si está presente) y expresión incrementada de SSEA-1. Las células madre embrionarias humanas no diferenciadas tienen típicamente actividad de fosfatasa de alcalina, que se puede detectar mediante la fijación de las células con paraformaldehído al 4%, y luego en desarrollo con Vector Red como sustrato, como se describe por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Células madre indiferenciadas pluripotentes también expresan típicamente Oct-4 y TERT, según lo detectado por RT-PCR.

Otro fenotipo deseable de células madre embrionarias humanas propagadas es un potencial de diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos endodérmicos, mesodérmicos y ectodérmicos. Pluripotencia de las células madre embrionarias humanas se puede confirmar, por ejemplo, mediante la inyección de células en ratones SCID, fijando los teratomas que se forman usando 4% de paraformaldehído, y después de examinarlos histológicamente para la evidencia de tipos de células de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia se puede determinar mediante la creación de cuerpos embrioides y la evaluación de los cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

Líneas de células madre embrionarias humanas propagadas pueden cariotiparse utilizando una técnica de bandedo G estándar y comparadas a cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tienen un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en las que todos los cromosomas humanos están presentes y no notablemente alterados.

*Cultivo de células madre embrionarias humanas:* En una realización, las células madre embrionarias humanas se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero no obstante apoya la proliferación de células madre embrionarias humanas, sin someterse a la diferenciación sustancial.

El crecimiento de las células madre embrionarias humanas en cultivo libre de alimentador sin diferenciación se apoya usando un medio acondicionado mediante el cultivo previamente con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de las células madre embrionarias humanas en cultivo libre de alimentador sin diferenciación se apoya usando un medio químicamente definido.

En una realización alternativa, las células madre embrionarias humanas son inicialmente capa cultivada de células alimentadoras que soportan las células madre embrionarias humanas de varias maneras. El embionario humano se transfiere entonces a un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero no obstante

apoya la proliferación de células madre embrionarias humanas, sin someterse a la diferenciación sustancial.

Los ejemplos de medios condicionados adecuados para su uso en la presente invención se describen en US200200721 17, US6642048, W02005014799, y Xu *et al.* (Stem Cells 22: 972980, 2004).

5 Un ejemplo de un medio químicamente definido adecuado para su uso en la presente invención se puede encontrar en US20070010011.

10 Medios de cultivo adecuados puede estar hechos de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco n° 11965092; medio de Knockout Dulbecco modificado de Eagle (KO DMEM), Gibco n° 10829018; medio de base DMEM de Ham F12/50%; L-glutamina 200 mM, Gibco n° 15039027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050; β-mercaptoetanol, Sigma n° M7522; factor humano recombinante de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), Gibco n° 13256-029.

15 En una realización, las células madre embrionarias humanas se cultivan en placas sobre un sustrato de cultivo adecuado que es tratado antes del tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención.

20 En una realización, el tratamiento es un componente de la matriz extracelular, tal como, por ejemplo, aquellos derivados de membrana basal o que pueden formar parte de acoplamiento de receptor-ligando de molécula de adhesión. En una realización, un sustrato del cultivo adecuado es Matrigel® (Becton Dickenson). Matrigel® es una preparación soluble a partir de células tumorales Engelbreth-Holm-Swarm que los geles a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

25 Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como una alternativa. Esto puede incluir la laminina, fibronectina, proteoglicanos, entactina, heparán sulfato, y similares, solos o en varias combinaciones.

30 Las células madre embrionarias humanas se sembraron en el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueve la supervivencia celular, propagación, y la retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una cuidadosa atención a la distribución de la siembra y se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica.

**Aislamiento, expansión y cultivo de células que expresan marcadores de pluripotencia que se derivan de células madre embrionarias humanas**

35 En una realización, las células que expresan marcadores de pluripotencia se derivan de células madre embrionarias humanas por un método que comprende las etapas de:

- 40 a. El cultivo de células madre embrionarias humanas,
- b. Diferenciación de las células madre embrionarias humanas en células que expresan marcadores característicos de las células endodérmicas definitivas, y
- 45 c. Extracción de las células, y, posteriormente, el cultivo de las mismas en condiciones de hipoxia, sobre un sustrato de cultivo de tejidos que no se tratan previamente con una proteína o una matriz extracelular antes de cultivar las células.

50 En una realización, las células que expresan marcadores de pluripotencia se derivan de células madre embrionarias humanas por un método que comprende las etapas de

- a. El cultivo de células madre embrionarias humanas, y
- 55 b. La extracción de las células, y, posteriormente, el cultivo de las mismas en condiciones de hipoxia, sobre un sustrato de cultivo de tejidos que no se tratan previamente con una proteína o una matriz extracelular.

**Cultivo de células en condiciones hipóxicas en un sustrato de cultivo de tejidos que no está pretratado con una proteína o una matriz extracelular**

60 En una realización, las células se cultivan en condiciones de hipoxia, sobre un sustrato de cultivo de tejidos que no está recubierto con una matriz extracelular durante aproximadamente 1 a aproximadamente 20 días. En una realización alternativa, las células se cultivan en condiciones de hipoxia, sobre un sustrato de cultivo de tejidos que no está recubierto con una matriz extracelular por alrededor de 5 a aproximadamente 20 días. En una realización alternativa, las células se cultivan en condiciones de hipoxia, sobre un sustrato de cultivo de tejidos que no está recubierto con una matriz extracelular durante unos 15 días.

65

En una realización, la condición hipóxica es de aproximadamente 1% O<sub>2</sub> a aproximadamente 20% O<sub>2</sub>. En una forma de realización alternativa, la condición hipóxica es de aproximadamente 2% O<sub>2</sub> a aproximadamente 10% O<sub>2</sub>. En una forma de realización alternativa, la condición hipóxica es de aproximadamente 3% O<sub>2</sub>.

5 Las células se pueden cultivar, bajo condiciones de hipoxia en un sustrato de cultivo de tejidos que no es tratado previamente con una proteína o una matriz extracelular, en medio que contiene suero, activina A, y un ligando de Wnt. Alternativamente, el medio puede contener también IGF-1.

10 El medio de cultivo puede tener una concentración en suero en el intervalo de aproximadamente 2% a aproximadamente 5%. En una realización alternativa, la concentración en suero puede ser de aproximadamente 2%.

15 La activina A se puede usar a una concentración de aproximadamente 1pg/ml a aproximadamente 100µg/ml. En una realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 1pg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 1pg/ml sobre 100ng/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 50ng/ml a aproximadamente 100ng/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 100ng/ml.

20 El ligando Wnt puede ser seleccionado del grupo que consiste de Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt7a. En una realización, el ligando Wnt es Wnt-1. En una realización alternativa, el ligando Wnt es Wnt-3a.

El ligando Wnt se puede usar a una concentración de aproximadamente 1ng/ml a aproximadamente 1000ng/ml. En una realización alternativa, el ligando Wnt se puede usar a una concentración de aproximadamente 10ng/ml a aproximadamente 100ng/ml. En una realización, la concentración del ligando Wnt es de aproximadamente 20ng/ml.

25 IGF-1 puede ser usado en una concentración de aproximadamente 1ng/ml a aproximadamente 100ng/ml. En una realización alternativa, el IGF-1 puede utilizarse a una concentración de aproximadamente de 10ng/ml a aproximadamente 100ng/ml. En una realización, la concentración de IGF-1 es de aproximadamente 50ng/ml.

30 Las células que expresan marcadores de pluripotencia derivados por los métodos de la presente invención son capaces de expansión en cultivo en condiciones de hipoxia, en sustrato de cultivo de tejidos que no se trata previamente con una proteína o una matriz extracelular.

35 Las células que expresan marcadores de pluripotencia derivados por los métodos de la presente invención expresan al menos uno de los siguientes marcadores de pluripotencia seleccionados del grupo que consiste en. ABCG2, cripto, FoxD3, conexina43, conexina45, Oct4, SOX-2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tral-60 y Tral-81.

**Diferenciación adicional de las células que expresan marcadores característicos del linaje definitivo endodérmico**

40 Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo pueden estar diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endodérmico por cualquier método en la técnica.

45 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico de páncreas de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392 1401 (2006).

50 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian además en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina, retirando el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblastos y KAADciclopamina y, posteriormente, cultivar las células en medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblastos y KAADciclopamina. Un ejemplo de este método se describe en D' Amour *et al.*, Nature Biotechnology, 24: 13921401, (2006).

60 Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se seleccionan del grupo que consiste en Pdx-1, HNF-1Beta, PTF1a, HNF-6, HB9 y PROX1. Adecuado para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático es una célula de endodermo pancreático.

**Diferenciación adicional de las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endodérmico**

65

Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden ser diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático por cualquier método en la técnica.

5 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour *et al.*, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

10 Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN-3, NeuroD, Islote-1, Pdx-1, NKX6.1, Pax-4, y PTF1 alfa. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa hormona pancreática. Alternativamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula de la hormona secretora pancreática.

15 En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$ . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  expresa Pdx-1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, NKX2.2, NKX6.1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4 y Pax6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  es una célula  $\beta$ .

#### 25 **La detección de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo**

La formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se puede determinar mediante pruebas de la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Las células madre pluripotentes normalmente no expresan tales marcadores. Por lo tanto, la diferenciación de células pluripotentes se detecta cuando las células comienzan a expresarlas.

30 La eficiencia de la diferenciación se puede determinar mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína expresada por células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

35 Los métodos para evaluar la expresión de proteínas y marcadores de ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son estándares en la técnica. Estos incluyen la reacción cuantitativa en cadena de I polimerasa inversa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Eds. 2001 suplemento)), y los inmunoensayos, tales como el análisis inmunohistoquímico de material seccionado, Western Blot, y para los marcadores que son accesibles en células intactas, el análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: a Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

40 Los ejemplos de anticuerpos útiles para la detección de ciertos marcadores de proteínas se enumeran en la **Tabla IA**. Cabe señalar que los anticuerpos alternativos dirigidos a los mismos marcadores que son reconocidos por los anticuerpos listados en la **Tabla IA** están disponibles, o se pueden desarrollar fácilmente. Tales anticuerpos alternativos también pueden emplearse para evaluar la expresión de marcadores en las células aisladas de acuerdo con la presente invención.

45 Por ejemplo, características de las células madre pluripotentes son bien conocidas para los expertos en la técnica, y las características adicionales de las células madre pluripotentes continúan identificándose. Marcadores de células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FoxD3, conexina43, conexina45, Oct4, Sox-2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tral60, Tral-81.

50 Después de tratar células madre pluripotentes con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas se pueden purificar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína, tal como CXCR4, expresado por las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

#### 55 **La detección de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático**

60 Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son bien conocidos para los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje endodérmico pancreático continúan identificándose. Estos marcadores se pueden usar para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje endodérmico pancreático. Marcadores específicos de linaje pancreático endodérmico incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales

65

como, por ejemplo, HlxB9, PTF1a, Pdx1, HNF-6, HNF1beta.

La eficiencia de la diferenciación se puede determinar mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína expresada por células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático.

Los métodos para evaluar la expresión de proteínas y marcadores de ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son estándares en la técnica. Estos incluyen la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa inversa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Eds. 2001 suplemento)), y los inmunoensayos, tales como el análisis inmunohistoquímico de material seccionado, transferencia de Western, y para los marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

Los ejemplos de anticuerpos útiles para la detección de ciertos marcadores de proteínas se enumeran en la **Tabla IA**. Cabe señalar que los anticuerpos alternativos dirigidos a los mismos marcadores que son reconocidos por los anticuerpos listados en la **Tabla IA** están disponibles, o se pueden desarrollar fácilmente. Tales anticuerpos alternativos también pueden emplearse para evaluar la expresión de marcadores en las células aisladas de acuerdo con la presente invención.

#### **La detección de las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático**

Marcadores característicos de las células del linaje endocrino pancreático son bien conocidos para los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje endocrino pancreático continúan identificándose. Estos marcadores se pueden usar para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje endocrino pancreático. Marcadores específicos de linaje endocrino pancreático incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales como, por ejemplo, NGN-3, NeuroD, Islote-1.

Marcadores característicos de las células del linaje de células  $\beta$  son bien conocidos para los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje de células  $\beta$  continúan identificándose. Estos marcadores se pueden usar para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje de células  $\beta$ . Características específicas de linaje de células  $\beta$  incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales como, por ejemplo, Pdx1 (gene de homeobox pancreático y duodenal 1), Nkx2.2, Nkx6.1, Isl1, Pax6, Pax-4, NeuroD, Hnf1b, Hnf-6, Hnf-3beta y AFP, entre otros. Estos factores de transcripción están bien establecidos en la técnica para la identificación de células endocrinas. Véase, por ejemplo, Edlund (Nature Reviews Genetics 3: 524-632 (2002)).

La eficiencia de la diferenciación se puede determinar mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína expresada por células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. Alternativamente, la eficiencia de diferenciación puede ser determinada por la exposición de una población de células tratada a un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje de células  $\beta$ .

Los métodos para evaluar la expresión de proteínas y marcadores de ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son estándares en la técnica. Estos incluyen la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa inversa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Eds. 2001 suplemento)), y los inmunoensayos, tales como el análisis inmunohistoquímico de material seccionado, Western Blot, y para los marcadores que son accesibles en células intactas, el análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: a Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

Los ejemplos de anticuerpos útiles para la detección de ciertos marcadores de proteínas se enumeran en la **Tabla IA**. Cabe señalar que los anticuerpos alternativos dirigidos a los mismos marcadores que son reconocidos por los anticuerpos listados en la **Tabla IA** están disponibles, o se pueden desarrollar fácilmente. Tales anticuerpos alternativos también pueden emplearse para evaluar la expresión de marcadores en las células aisladas de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no se limita por los siguientes ejemplos.

#### **Ejemplo de referencia 1 Cultivo de células madre embrionarias humanas**

Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad en el nivel de células individuales tanto para autorenovarse como diferenciarse para producir células de la progenie, incluyendo progenitores de

autorenovación, progenitores de no renovación y células diferenciadas terminalmente. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

Las líneas de células madre embrionarias humanas H1, H7 y H9 se obtuvieron de WiCell Research Institute, Inc., (Madison, WI) y se cultivaron según las instrucciones proporcionadas por el instituto de origen. Brevemente, las células se cultivaron en células de alimentación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en medio de células ES que consisten en DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) suplementado con sustitución de suero de knockout 20%, 100 nM MEM aminoácidos no esenciales, 0,5 mM beta-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina con 4ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humano básico (bFGF) (todos de Invitrogen/GIBCO). Células MEF, derivadas de E13 a 13,5 embriones de ratón, fueron adquiridos de Charles River. Células MEF se expandieron en medio DMEM suplementado con 10% FBS (Hyclone), 2 mM glutamina, y 100 mM MEM de aminoácidos no esenciales. Los cultivos de células MEF subconfluentes se trataron con 10µg/ml de mitomicina C (Sigma, St. Louis, MO) durante 3h para detener la división celular, a continuación, se tripsinizaron y se sembraron en placas a  $2 \times 10^4/cm^2$  en 0,1% placas revestidas de gelatina bovina. Las células MEF de paso a través de dos de cuatro fueron utilizadas como capas de alimentación. Las células madre embrionarias recubiertas de capas alimentadoras de células MEF se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/dentro de un incubador de cultivo de tejidos humidificado. Cuando confluentes (aproximadamente 5-7 días después de la siembra), las células madre embrionarias humanas fueron tratadas con 1 mg/ml de colagenasa de tipo IV (Invitrogen/GIBCO) durante 5-10 min y luego suavemente raspadas de la superficie usando una pipeta de 5 ml. Las células se centrifugaron a 900 rpm durante 5 mm, y el sedimento se resuspendió y se volvió a sembrar en una relación de células de 1: 3 a 1: 4 en medio de cultivo fresco.

En paralelo, células madre embrionarias humanas H1, H7, y H9 también fueron sembradas en placas revestidas con una dilución 1:30 de factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ (BD Biosciences) y se cultivaron en medios condicionados por MEF suplementados con 8 ng/ml de bFGF. Las células cultivadas en MATRIGEL™ se pasaron rutinariamente con colagenasa IV (Invitrogen/GIBCO), dispasa (BD Biosciences) o enzima de liberasa (Fuente). Algunas de los cultivos de células madre embrionarias humanas se incubaron en condiciones de hipoxia (aproximadamente 3% O<sub>2</sub>).

#### **Ejemplo de referencia 2 Derivación y cultivo de células que expresan marcadores de pluripotencia, derivados de células madre embrionarias humanas**

Las células de las líneas de células madre embrionarias humanas H1 y H9 varios pasajes (Pasaje 30-54) se cultivaron en condiciones de hipoxia (aproximadamente 3% O<sub>2</sub>) para al menos tres pasajes. Las células se cultivaron en MEF-CM suplementadas con 8 ng/ml de bFGF y se sembraron en placas recubiertas de MATRIGEL de acuerdo con el **Ejemplo de referencia 1**.

Las células se trataron entonces con medio DMEM/FL2 suplementado con 0,5% de FBS, 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo nº 1324WN002, R&D Systems, MN), y 100 ng/ml Activina-A (R&D Systems, MN) durante dos días seguido de tratamiento con medios DMEM/F12 suplementados con FBS al 2% y 100 ng/ml Activina-A (AA) por un período adicional de 3 a 4 días. Este protocolo resultó en la regulación positiva significativa de los marcadores endodérmicos definitivos.

Las células se trataron entonces con solución TrypLE™ Express (Invitrogen, CA) durante 5 minutos. Las células liberadas se resuspendieron en medio DMEM-F12 + 2% de FBS, se recuperó por centrifugación, y se contaron usando un hemocitometro. Las células liberadas se sembraron a 1000-10.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces tratadas con poliestireno de cultivo tisular (TCPS) y se cultivaron en DMEM-F12 + 2% de FBS + 100 ng/ml activina-A + 20 ng/ml de WNT-3A en condiciones de hipoxia (aproximadamente 3% O<sub>2</sub>) a 37°C en una incubadora de cultivo de tejidos estándar. Los matraces TCPS no se recubrieron con MATRIGEL u otras proteínas de la matriz extracelular. El medio se cambió diariamente. En algunos cultivos, el medio se suplementó adicionalmente con 10-50 ng/ml de IGF-I (factor de crecimiento de insulina I de R&D Systems, MN) o IX ITS (insulina, transferina, y el selenio de Invitrogen, Ca). En algunas de las condiciones de cultivo del medio de base (DM-F12 + 2% FBS) se complementó adicionalmente con 0,1 mM mercaptoetanol (Invitrogen, CA) y aminoácidos no esenciales (IX, NEAA de Invitrogen, CA).

Después de 5 a 15 días de cultivo, las colonias de células distintas aparecían rodeadas por un gran número de células agrandadas que parecen estar en senescencia. En aproximadamente 50 a 60% de confluencia, los cultivos se pasaron por la exposición a solución TrypLE™ Express para 5 minutos a temperatura ambiente. Las células liberadas se resuspendieron en DMEM-F12 + 2% medio FBS, recuperado por centrifugación, y se sembraron a 10.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces tratados con poliestireno de cultivo de tejidos (TCP5) en DMEM-F12 + 2% de FBS + 100 ng/ml activina-A + 20 ng/ml de WNT-3A +/- 50 ng/ml de IGF-I. Este medio se denominará en adelante el "medio de cultivo".

#### **Ejemplo de referencia 3 Derivación de células que expresan marcadores de pluripotencia a partir de una**



### suspensión de células individuales de las células madre embrionarias humanas

Las células líneas de células madre embrionarias humanas H1 P33 y H9 P45 se cultivaron en condiciones de hipoxia (aproximadamente 3% O<sub>2</sub>) durante al menos tres pasajes. Las células se cultivaron en MEF-CM suplementado con 8 ng/ml de bFGF y se sembraron en placas recubiertas MATRIGEL de acuerdo con el **Ejemplo 1**. En aproximadamente 60% de confluencia, los cultivos se expusieron a la solución TrypLE™ Express (Invitrogen, CA) durante 5 minutos. Las células liberadas se resuspendieron en DMEM-F12 + medio FBS al 2%, se recuperó por centrifugación, y se contaron usando un hemocitómetro. Las células liberadas se sembraron a 1.000 a 10.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces tratados de poliestireno de cultivo tisular (TCPS) y se cultivaron en DM-F12 + 2% FBS + 100 ng/ml activina-A + 20 ng/ml WNT-3A + 50 ng/ml de IGF-I + 0,1 mM mercaptoetanol (Invitrogen, CA) y aminoácidos no esenciales (1X, NEAA de Invitrogen, CA) en condiciones hipóxicas (aproximadamente 3% O<sub>2</sub>) a 37 °C en incubadora de cultivo de tejidos estándar. Los matraces TCPS no se recubrieron con MATRIGEL u otras proteínas de la matriz extracelular. El medio se cambió diariamente. Las primeras células de paso se conocen como P1.

### Ejemplo de referencia 4 Varios medios de crecimiento útil para la expansión de células que expresan marcadores de pluripotencia derivados de células madre embrionarias humanas

Las células que expresan marcadores de pluripotencia derivados de células madre embrionarias humanas han sido cultivadas con éxito en las siguientes composiciones de medios para al menos 230 pasajes:

1. DM-F12 + 2% de FBS + 100 ng/ml AA 20 ng/ml WNT-3A
2. DM-F12 + 2% de FBS + 100 ng/ml AA + 20 ng/ml de WNT-3A + 50 ng/ml IGF-I
3. DM-F12 + 2% de FBS + Loong/m1AA + 20 ng/ml de WNT-3A + 10 ng/ml IGF-I
4. DM-F12 + 2% de FBS + 50 ng/ml AA + 20 ng/ml de WNT-3A + 50 ng/ml IGF-I
5. DM-F12 + 2% de FBS + 50 ng/ml AA + 10 ng/ml de WNT-3A + 50 ng/ml IGF-I
6. DM-F12 + 2% de FBS + 50 ng/ml AA + 20 ng/ml de WNT-3A + 10 ng/ml IGF-I
7. DM-F12 + 2% de FBS + 100 ng/ml AA + 10 ng/ml WNT-3A + 10 ng/ml IGF-I
8. Medios definidos HEScGRO (Chemicon, CA)

El componente basal de los medios arriba mencionados puede ser sustituido por medios similares, tales como, RPMI, DMEM, CRML, Knockout™DMEM y F12.

### Ejemplo de referencia 4 Efectos de los inhibidores de actividad enzimática GSK-3β en la viabilidad de células que expresan marcadores de pluripotencia

La derivación y mantenimiento de las células que expresan los fabricantes de pluripotencia se llevó a cabo como se ha descrito en el **Ejemplo 2**. Las células se cultivaron en DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS (Invitrogen), 100 ng/ml Activina A, 20 ng/ml Wnt-3a, y 50 ng/ml de IGF (R&D Biosystems). Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de poliestireno Falcon y se cultivaron en cultivo en monocapa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. bajo oxígeno. Después de alcanzar 60-70% de confluencia, las células se pasaron por lavado de la monocapa con PBS e incubación con TrypLE (Invitrogen) durante 35 minutos para permitir la separación y la dispersión de células individuales.

El cribado se llevó a cabo utilizando los compuestos de ensayo de una biblioteca patentada de moléculas pequeñas seleccionadas por su capacidad para inhibir la actividad de la enzima GSK-3B. Se hicieron disponibles compuestos de esta biblioteca como 1 mM reservas, en un formato de placa de 96 pocillos en 50 mM HEPES, 30% de DMSO. Para el ensayo, se lavaron las células que expresan marcadores de pluripotencia, se contaron, y se sembraron en medio de cultivo normal en una densidad de siembra de 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo claro, de pocillo oscuro (Costar). Esta densidad de siembra se determinó previamente para producir la formación de monocapa óptima en cultivo durante la noche. Al día siguiente, se eliminó el medio de cultivo, las monocapas de células se lavaron tres veces con PBS, y se añadieron los compuestos de ensayo a los pocillos en alícuotas de 80µl, cada una diluida en medio de ensayo a una concentración de ensayo final de 10µM. En el día 2 del ensayo, el medio se retiró de cada pocillo y se reemplazó con una alícuota fresca de compuestos de ensayo diluidos en medio de ensayo. El medio de ensayo en los días 1 y 2 de cultivo consistió en DMEM:F12 suplementado con 0,5% de FCS y 100ng/ml de Activina A. En los días 3 y 4 de cultivo, el medio se retiró de cada pocillo y se reemplazó con DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml de Activina A (sin compuesto de ensayo). En el día 4 de ensayo, se añadió 15µl de MTS (Promega) a cada pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 1,5 a 4 horas

antes de la lectura de la densidad óptica a 490 nm en un instrumento SpectraMax (Molecular Devices). Se calcularon medidas estadísticas que constan de media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada conjunto duplicado. La toxicidad se calcula para cada pocillo de ensayo con relación a un control positivo (pocillos tratados con Activina A y Wnt3a en los días 1 y 2 del cultivo).

La **Tabla II** es una recopilación de todos los resultados de la prueba. Las células que expresan marcadores de pluripotencia se sembraron inicialmente como una monocapa confluyente en este ensayo; por lo tanto, los resultados son representativos de una medida de toxicidad durante el periodo de cultivo de cuatro días. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad de control, y demuestran la toxicidad variable para algunos compuestos a la concentración de cribado de 10 $\mu$ M utilizada. Una mayor proporción de los compuestos tienen toxicidad mínima o no mensurable en este ensayo a base de células.

Un pequeño panel de compuestos selectos se puso a prueba de repetición durante un estrecho intervalo de dosis de titulación, usando de nuevo las células que expresan marcadores de pluripotencia en un ensayo similar al descrito anteriormente. La **Tabla III** es un resumen de estos resultados, demostrando efectos de titulación de dosis variable para una gama de compuestos tóxicos y no tóxicos.

### **Ejemplo de referencia 5 Efectos de los inhibidores de la actividad enzimática GSK-3 $\beta$ en la diferenciación y proliferación de células madre embrionarias humanas determinadas utilizando un ensayo de cribado de alto contenido**

Se llevó a cabo el mantenimiento de células madre embrionarias humanas (línea H9) como se describió en el **Ejemplo 1**. Las colonias de células en un estado indiferenciado, pluripotente con el paso en promedio cada cuatro días. El paso se realizó mediante la exposición de cultivos de células a una solución de colagenasa (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) durante 10 a 30 minutos a 37°C seguido por raspado suave con una punta de pipeta para recuperar grupos de células. Las agrupaciones se dejan sedimentar por gravedad, seguido de lavado para eliminar la colagenasa residual. grupos de células se dividieron en una relación 1: 3 para el cultivo de mantenimiento de rutina o una relación 1: 1 para el ensayo inmediato. Las líneas de células madre embrionarias humanas utilizadas se mantuvieron a números de pasos de menos de paso 50 y se evalúan rutinariamente para fenotipo cariotípico normal y ausencia de contaminación por micoplasma.

Los grupos de células utilizados en el ensayo se volvieron a suspender uniformemente en medio de cultivo normal y se sembraron en Packard VIEWPLATES de 96 pocillos revestido de MATRIGEL (PerkinElmer) en volúmenes de 100 $\mu$ l/pocillo. El medio acondicionado MEF suplementado con bFGF 8ng/ml se utilizó para el revestimiento y la recuperación inicial. La alimentación diaria se llevó a cabo mediante la aspiración de medio de cultivo gastado de cada pocillo y la sustitución con un volumen igual de medio fresco. Las placas se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada durante la duración del ensayo.

El cribado se llevó a cabo utilizando los compuestos de ensayo de una biblioteca patentada de moléculas pequeñas seleccionadas por su capacidad para inhibir la actividad de la enzima GSK-3B. Se hicieron disponibles compuestos de esta biblioteca como 1 mM reservas, en un formato de placa de 96 pocillos en 50 mM de HEPES, 30% de DMSO. Compuestos de cribado se ensayaron por triplicado o conjuntos duplicados. Los ensayos de cribado primarios se iniciaron mediante la aspiración de medio de cultivo de cada pocillo, seguido de tres lavados en PBS para eliminar los factores de crecimiento residuales y suero. Volúmenes de ensayo de 80 a 100  $\mu$ l por pocillo se añadieron de nuevo conteniendo medio de base DMEM:F12 (Invitrogen) suplementado con 0,5% de FCS (HyClone) y 100ng/ml de activina-A (R&D Biosystems) más un compuesto de ensayo 10 $\mu$ M. Los pocillos de control positivos contenían el mismo medio de base, sustituyendo 10-20ng/ml Wnt3a (R&D Biosystems) para el compuesto de ensayo. Pocillos de control negativo contenían medio de base con 0,5% de FCS y Activina A sola (AA solamente) o alternativamente, 0,5% de FCS sin Activina A o Wnt3a (sin tratamiento). Los pocillos se aspiraron y se alimentaron de nuevo con soluciones idénticas en el día 2 de ensayo. En los días 3 y 4, todos los pocillos de ensayo se aspiraron y se convirtieron en DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml de Activina A (sin compuesto de ensayo o Wnt-3a); pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en medio de base DMEM:F12 con FCS al 2% y la Activina A (sólo AA) o alternativamente, 2% de FCS sin Activina A (sin tratamiento).

Al final del cultivo, las células en placas de 96 pocillos se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron tres veces con PBS, y después se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente, las células se fijaron con hielo frío de etanol al 70% durante la noche a 20°C, se lavaron tres veces con PBS, y luego se permeabilizaron con Triton X-100 durante 5 minutos a 4°C. Después de la fijación y permeabilización, las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS y después se bloquearon con suero de pollo al 4% (Invitrogen) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (Sox17 antihumano de cabra y HNF-3beta antihumano de cabra; R&D Systems) se diluyeron 1: 100 en suero de pollo al 4% y se añadieron a las células durante una hora a temperatura ambiente. Anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor 488 (IgG anti-cabra de pollo; Molecular Probes) se diluyó 1: 200 en PBS y se añadió después de lavar las células tres veces con PBS. Para contrateñir los núcleos, se añadió 5 mM Draq5 (Alexis Biochemicals) durante cinco minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron

en 100 ml/pocillo de PBS para visualizaron.

Las células se visualizaron usando un IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando la 51008bs dicroico para las células teñidas con Draq5 y Alexa Fluor 488. Tiempos de exposición fueron optimizados utilizando pocillos de control positivos y pozos con secundario sólo para los controles negativos sin tratar. Se obtuvieron doce campos por pocillo para compensar cualquier pérdida de células durante los procedimientos de tratamiento y de tinción. Los números de células totales y la intensidad total de células para Sox-17 y HNF-3beta se midieron utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.6 (GE Healthcare). Se determinó la segmentación para los núcleos sobre la base de los niveles de escala de grises (rango de referencia 100-300) y el tamaño nuclear. Promedios y desviaciones estándar se calcularon para repeticiones. La expresión de proteína total se informó como intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la zona de tiempos celulares de la célula. Los antecedentes fueron eliminados en base a criterios de aceptación de los rangos de escala de grises entre 300 a 3.000 y factores de forma mayores que o iguales a 0,4. Los datos de intensidad totales se normalizaron dividiendo las intensidades totales para cada pocillo por la intensidad total media para el control positivo Wnt-3a/activina A. Los datos normalizados se calcularon para los promedios y desviación estándar para cada conjunto de réplica.

La **Tabla IV** es un resumen representativo de todos los resultados de detección. La **Tabla V** es una lista de resultados positivos de este examen. Resultados fuertes se definen como los mayores o igual a 120% de los valores de control; resultados moderados se definen como los que caen dentro del intervalo de 60-120% de los valores de control. Un número significativo de compuestos inducen una respuesta proliferativa en este ensayo. En paralelo, un número significativo de compuestos induce la diferenciación en este ensayo, tal como se mide por la expresión de la proteína de factores de transcripción Sox17 y Hnf-3b.

**Ejemplo de referencia 6 Efectos de inhibidores de la actividad enzimática GSK-3β en la proliferación de células madre embrionarias humanas determinadas usando un ensayo de lector de placas**

Se llevó a cabo el mantenimiento de células madre embrionarias humanas (líneas H9 o H1) como se describe en el **Ejemplo 1**. Las colonias de células se mantuvieron en un estado indiferenciado, pluripotente con el paso, en promedio, cada cuatro días. El paso se realizó mediante la exposición de cultivos de células a una solución de colagenasa (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) durante 10 a 30 minutos a 37°C seguido por raspado suave con una punta de pipeta para recuperar grupos de células. Los grupos se sedimentaron y se lavaron para eliminar la colagenasa residual. Grupos de células se dividieron en una proporción de 1: 3 de área de monocapa para cultivo de rutina o una proporción 1: 1 para el ensayo inmediato. Las líneas de células madre embrionarias humanas utilizadas para estos ejemplos se mantuvieron a números de paso de menos de 50 y se evaluaron rutinariamente para fenotipo cariotípico normal, así como ausencia de contaminación de micoplasma.

Grupos de células utilizadas en el ensayo se volvieron a suspender de manera uniforme en un medio de cultivo normal y se sembraron en Packard VIEWPLATES de 96 pocillos revestido de MATRIGEL (PerkinElmer) en volúmenes de 100 µl/pocillo. Medio acondicionado MEF suplementado con 8ng/ml de bFGF se utilizó para el revestimiento y la recuperación inicial. La alimentación diaria se llevó a cabo mediante la aspiración de medio de cultivo gastado de cada pocillo y la sustitución con un volumen igual de medio fresco. Las placas se mantuvieron a 37°C en una caja humidificada, 5% de CO<sub>2</sub> durante la duración del ensayo.

Los ensayos de cribado primario se iniciaron mediante la aspiración de medio de cultivo de cada pocillo, seguido de tres lavados en PBS para eliminar los factores de crecimiento residuales y suero. Volúmenes de ensayo de 80-100µl por pocillo se añadieron de nuevo conteniendo medio de base DMEM:F12 (Invitrogen) suplementado con 0,5% de FCS (Hyclone) y 100 ng/ml activina A (R&D Biosystems) y compuesto de prueba 10µM. los pocillos de control positivos contenían el mismo medio de sustitución de 10-20ng/ml Wnt3a (R&D Biosystems). Pocillos de control negativos contenían medio de base con 0,5% de FCS sin activina A o Wnt-3a. Los compuestos de cribado se ensayaron por triplicado. Los pocillos se aspiraron y se alimentaron de nuevo con soluciones idénticas en el día 2 del ensayo. En los días 3 y 4, todos los pocillos de ensayo se aspiraron y se convirtieron en DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml de activina A con la excepción de los pocillos de control negativos que se mantuvieron en medio base de DMEM:F12 con 2% de FCS .

En el día 4 de ensayo, se añadió 15-20µl de MTS (Promega) a cada pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 1,5 a 4 horas. Lecturas densitométricas en OD490 se determinaron usando un lector de placas espectrofotómetro de Molecular Devices. Lecturas medias para series de replicación se calcularon junto con la desviación y el coeficiente de variación. Pocillos experimentales se compararon con el control positivo de Activina A/Wnt3A para calcular un valor de control de por ciento como una medida de la proliferación.

La **Tabla VI** es un resumen representativo de todos los resultados de detección. La **Tabla VII** es una lista de los éxitos de esta prueba de detección. Los resultados positivos fuertes se definen como mayor que o igual a 120% de los valores de control; resultados positivos moderados se definen como aquellos que caen dentro del intervalo de 60-120% de los valores de control. Un número significativo de compuestos inducen una respuesta proliferativa en este ensayo.

### Ejemplo de referencia 7 Efectos de inhibidores de enzima GSK-3 $\beta$ en la diferenciación y proliferación de células madre embrionarias humanas: Titulación de dosis de compuestos principales

5 Era importante confirmar la actividad de resultados identificados a partir de cribado primario y analizar aún más la gama de la actividad por titulación de la dosis. Nuevas muestras de un subconjunto selectivo de los resultados de cribado primario se obtuvieron como polvos secos, solubilizados para hacer nuevos reactivos de reserva frescos, y se diluyeron en ensayos de confirmación secundarios para evaluar los efectos sobre las células madre embrionarias humanas.

10 Se llevó a cabo el cultivo de dos células madre embrionarias humanas (H1 y H9) como se describe en el **Ejemplo 1**. Las colonias de células se mantuvieron en un estado indiferenciado, pluripotente en plástico de poliestireno recubierto de Matrigel™ (Invitrogen), usando una dilución 1:30 de Matrigel™ en DMEM:F12 para recubrir la superficie. Las células se dividieron por el paso enzimático cada cuatro días en promedio. El paso se realizó mediante la exposición de monocapas de células a una solución de colagenasa (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) durante 10 a 60 minutos a 37°C seguido por raspado suave con una punta de pipeta para recuperar grupos de células. Las agrupaciones se dejaron sedimentar por gravedad, después se lavaron para eliminar la colagenasa residual. Los grupos de células se dividieron en una relación 1: 3 para el cultivo de mantenimiento o una relación 1:1 para el ensayo subsiguiente. Las líneas de células madre embrionarias humanas se mantuvieron a menos del paso 50 y se evaluaron rutinariamente para el fenotipo de cariotipo normal y ausencia de contaminación por micoplasma.

20 *Preparación de células para ensayo:* Agrupaciones celulares de las líneas celulares H1 o H9 madre embrionarias humanas utilizadas en el ensayo se volvieron a suspender uniformemente en medio de cultivo y se colocaron en Packard VIEWPLATES de 96 pocillos revestido de MATRIGEL™ (PerkinElmer) en volúmenes de 100 $\mu$ l/pocillo. Medio acondicionado MEF suplementado con 8ng/ml de bFGF se utilizó para la siembra inicial y la expansión. La alimentación diaria se llevó a cabo mediante la aspiración de medio de cultivo gastado de cada pocillo y la sustitución con un volumen igual de medio fresco. Se permitió que los cultivos se expandieran uno a tres días después de la siembra antes de iniciar el ensayo. Las placas se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada durante la duración del ensayo.

30 *Preparación de compuestos y medio de ensayo:* Un subconjunto de resultados que resultan del cribado primario se utilizó para el estudio de seguimiento y ensayos secundarios posteriores. Veinte compuestos disponibles como polvos secos se solubilizaron como 10mM de reservas en DMSO y se almacenaron desecados a -20°C hasta su uso. Inmediatamente antes del ensayo, las acciones de compuestos se diluyeron 1: 1000 para obtener el compuesto de prueba 10 $\mu$ M en medio de base DMEM:F12 (Invitrogen) suplementado con 0,5% de FCS (Hyclone) y 100ng/ml de activina A (R&D Biosystems). Esta se diluyó adicionalmente dos veces en serie para hacer una curva de dilución de siete puntos para cada compuesto, también en medio de base DMEM:F12 con 0,5% de FCS y 100ng/ml de Activina A.

40 *Ensayo de cribado secundario:* El ensayo se inició mediante la aspiración de medio de cultivo de las monocapas de células en cada pocillo, seguido de tres lavados en PBS para eliminar los factores de crecimiento residuales y suero. Volúmenes de ensayo de 100 $\mu$ l por pocillo se añadieron de nuevo que contenía medio con 0,5% de FCS y diferentes concentraciones de compuestos inhibidores con 100ng/ml de activina A, sin Wnt-3a. Los pocillos de control positivos contenían el mismo medio de base con 0,5% de FCS y con 20ng/ml Wnt3a (R&D Biosystems) en ausencia de compuesto de ensayo. Los pocillos de control negativo contenían el mismo medio de base con 0,5% de FCS, en ausencia de activina A, Wnt-3a, o compuesto de ensayo. Los pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron de nuevo con concentraciones idénticas del compuesto de prueba o soluciones de control en el día 2 de ensayo. En los días 3 y 4, todos los pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron con DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml de activina A en ausencia tanto de compuesto de ensayo como de Wnt-3a. Los pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en los días 3 y 4 en medio de base DMEM:F12 con FCS al 2%.

50 *Evaluación del ensayo:* Al final del cultivo, las células en placas de 96 pocillos se lavaron dos veces con PBS luego se fijaron con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavó tres veces más con PBS, y luego se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación y permeabilización, las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS y después se bloquearon con suero de pollo 4% (Invitrogen) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (Sox17 antihumano de cabra; R&D Systems) se diluyeron 1: 100 en suero de pollo al 4% y se añadió a las células durante una hora a temperatura ambiente. anticuerpo secundario conjugado por Alexa Fluor 488 (IgG anti-cabra de pollo; Molecular Probes) se diluyó 1: 200 en PBS y se añadió a cada pocillo después de lavar las células tres veces con PBS. Para contrateñir los núcleos, 2 $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) se añadió durante diez minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100  $\mu$ l/pocillo de PBS para visualizaron.

60 Las células se visualizaron usando un IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando dicroico 51008bs para las células teñidas con Hoechst 33342 y Alexa Fluor 488. Los tiempos de exposición fueron optimizados usando pocillos de control positivo y pocillos teñidos con anticuerpo secundario solo como un control negativo sin tratar. Imágenes de 15 campos por pocillo fueron adquiridos para compensar cualquier pérdida de células durante los procedimientos

de tratamiento y de tinción. Se obtuvieron mediciones para el número total de células y la intensidad total de Sox-17 para cada pocillo utilizando software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). Se determinó la segmentación para los núcleos sobre la base de los niveles de escala de grises (rango de referencia 100-300) y el tamaño nuclear. Promedios y desviaciones estándar se calcularon para cada conjunto de datos de replicados. La expresión de proteínas total Sox17 se informó como intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la zona de tiempos de células de la célula. Los antecedentes se eliminaron en base a criterios de aceptación de los rangos de escala de grises entre 300 a 3.000 y factores de forma mayores que o iguales a 0,4. Datos de intensidad total se normalizaron dividiendo las intensidades totales para cada pocillo por la intensidad total media para el control positivo Wnt-3a/Activina A. Los datos normalizados se calcularon para las medias y las desviaciones estándar para cada conjunto de duplicados.

## Resultados

Los resultados se muestran para ocho inhibidores de la enzima GSK-3 $\beta$  donde se confirmó la actividad y la potencia se determinó por valoración en este ensayo secundario. Los datos presentados muestran los efectos del compuesto sobre el número de células e intensidad de Sox-17 donde respectivos puntos de datos se promediaron a partir de un conjunto duplicado y extraído para cada parámetro de los campos y pozos idénticos. En este ejemplo, la expresión de Sox-17 es indicativa de la diferenciación endodérmica definitiva. Los resultados para el número de células y la intensidad de Sox17, respectivamente, utilizando la línea de células madre embrionarias humanas H1 se muestran en las **Tablas VIII** y **IX**. Resultados para la línea de células madre embrionarias humanas H9 se muestran en las **Tablas X** y **XI**. Los valores de control positivos se normalizaron a 1.000 para el número de células y la intensidad de Sox17. los valores de control negativo eran menos que 0,388 para el número de células y menos que 0,065 para la intensidad de Sox17 con ambas líneas celulares. Una representación gráfica de estos datos, comparando ambas líneas de células madre embrionarias humanas y que incluyen un ajuste de la dosis de cada compuesto, se proporciona en las **Figuras 1 a 8**. El número de células se presenta en el panel A; la intensidad Sox 17 se muestra en el panel B. Estos datos confirman que cada compuesto puede promover la proliferación celular hES y la diferenciación endodérmica definitiva e identificar un intervalo óptimo de actividad.

### Ejemplo de referencia 8 Efectos de inhibidores de enzima GSK-3 $\beta$ sobre la expresión de marcadores adicionales asociados con endodermo definitivo

Era importante demostrar que los compuestos principales también podrían inducir otros marcadores indicativos de diferenciación endodérmica definitiva, además del factor de transcripción Sox17. Un subconjunto seleccionado de los resultados se examinó por su capacidad para promover la expresión de CXCR4, una proteína receptora de la superficie, y HNF-3 beta, un factor de transcripción también asociado a la diferenciación endodérmica definitiva.

*Preparación de células para el ensayo:* agrupaciones celulares de las líneas de células madre embrionarias humanas H1 utilizadas en el ensayo se volvieron a suspender uniformemente en medio de cultivo y se colocaron en placas en placas de 6 pocillos (Corning) revestidas de MATRIGEL™ (dilución 1:30) en volúmenes de 2 ml/pocillo. Medio acondicionado MEF suplementado con 8 ng/ml de bFGF fue utilizado para la siembra inicial y la expansión. La alimentación diaria se llevó a cabo mediante la aspiración de medio de cultivo gastado de cada pocillo y la sustitución con un volumen igual de medio fresco. Se permitió que los cultivos se expandieran uno a tres días después del revestimiento antes de iniciar el ensayo. Las placas se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante la duración del ensayo.

*Reparación de compuestos y medio de ensayo:* Un subconjunto de siete resultados resultantes de cribado primario se usó para el estudio de seguimiento y ensayos secundarios posteriores. Los compuestos puros se solubilizaron como reservas de 10mM en DM50 y se almacenaron desecados a -20°C hasta su uso. Inmediatamente antes del ensayo, las reservas de compuestos se diluyeron a una concentración final que oscila entre 1 $\mu$ M y 5 $\mu$ M en medio de base DMEM:F12 (Invitrogen) suplementado con 0,5% de FCS (HyClone) y 100ng/ml de Activina A (R&D Biosystems).

*Ensayo:* El ensayo se inició mediante la aspiración de medio de cultivo de las monocapas de células en cada pocillo, seguido de tres lavados en PBS para eliminar los factores de crecimiento residuales y suero. Volúmenes de ensayo de 2ml por pocillo se añadieron de nuevo que contenía medio con 0,5% de FCS y diferentes concentraciones de compuestos inhibidores con 100ng/ml de Activina A, sin Wnt3a. los pocillos de control positivos contenían el mismo medio de base y 0,5% de FCS con 100ng/ml de activina A y 20ng/ml de Wnt3a (R&D Biosystems) en ausencia de compuesto de ensayo. Los pocillos de control negativo contenían medio de base con 0,5% de FCS, en ausencia de Activina A, Wnt3a, o compuesto de ensayo. Los pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron de nuevo con concentraciones idénticas del compuesto de prueba o soluciones de control en el día 2 de ensayo. En los días 3 y 4, todos los pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron con DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml de Activina A en ausencia tanto de compuesto de ensayo como Wnt3a. Los pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en los días 3 y 4 en Medio de base DMEM:F12 con FCS al 2%.

*Evaluación del ensayo:* Al final del cultivo, las monocapas de células se lavaron con PBS y se cosecha a partir de

placas de cultivo por incubación de 5 minutos con solución TrypLE™ Express (Invitrogen, CA). Las células se resuspendieron en medio acondicionado MEF y se dividió en dos muestras iguales. Un conjunto de muestras se tiñó adicionalmente con diversos anticuerpos marcados con fluorescencia y se sometió a análisis citométrico de flujo (FACS). Un segundo conjunto paralelo de muestras se sometió a PCR cuantitativa.

Las células para el análisis de FACS se lavaron en PBS y se bloquearon durante 15 minutos a 4°C en 0.125% de gammaglobulina humana (Sigma cat n° G-4386) diluida en tampón de tinción PBS y BD FACS. Las alícuotas de células (aproximadamente 10<sup>5</sup> células cada una) se tiñeron durante 30 minutos a 4°C con anticuerpos conjugados directamente a una etiqueta fluorescente y que tiene especificidad para CD9 PE (BD#555372), CD99 PE (Caltag#MHCD9904), o CXCR-4 APC (R&D Systems cat n° FAB173A). Tras una serie de lavados en tampón de tinción BD FACS, las células se tiñeron con 7-AAD (BD# 559925) para evaluar la viabilidad y se analizaron en un instrumento de matriz BD FACS (BD Biosciences), recogiendo al menos 10.000 eventos. Los anticuerpos de control de isotipo IgG<sub>k</sub> de ratón tanto para PE como para APC se utilizaron para separar secuencialmente células de porcentaje positivo.

Las células para la PCR cuantitativa se procesaron para extracción de ARN, purificación, y la síntesis a ADNc. Las muestras de ARN se purificaron mediante la unión a una membrana de gel de sílice (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) en presencia de un tampón que contiene etanol, alta en sal seguido de lavado para eliminar los contaminantes. El ARN se purificó adicionalmente usando un kit libre de ADN TURBO (Ambion, Inc.), y el ARN de alta calidad se eluyó en agua. El rendimiento y la pureza se evaluaron mediante lecturas de A260 y A280 en un espectrofotómetro. Copias de ADNc se hicieron a partir de ARN purificado utilizando un kit de archivo ADNc de alta capacidad de Applied Biosystems, Inc. (ABI, CA).

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos para amplificación y cuantificación de PCR en tiempo real fueron adquiridos de ABI. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron usando el sistema de detección de secuencias ABT PRISM 7900. TAQMAN UNIVERSAL PCR MASTER MIX (ABI, CA) se utilizó con 20 ng de ARN inversamente transcrito en un volumen total de reacción de 20 µl. Cada muestra de ADNc se realizó por duplicado para corregir los errores de pipeteo. Los cebadores y sondas TAQMAN etiquetados por FAM se utilizaron a concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión de cada gen diana se normalizó usando control endógeno de deshidrogenasa de gliceraldehida-3-fosfato humana (GAPDH) previamente desarrollado por ABI. Conjuntos de cebador y sonda se enumeran de la siguiente manera: CXCR4 (Hs00237052), GAPDH (4310884E), HNF3b (Hs00232764), SOX17 (parte de sonda # 450025, parte delantera y trasera # 4304971).

Después de una incubación inicial a 50°C durante 2 min seguido de 95°C durante 10 min, las muestras se sometieron a ciclos 40 veces en dos etapas, una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 seg, seguido de una etapa de hibridación/extensión a 60°C para 1 min. El análisis de datos se realizó utilizando el software GENEAMP 7000 Sequence Detection System. Para cada conjunto de cebador/sonda, un valor Ct se determinó como el ciclo en el cual la intensidad de la fluorescencia alcanzó un valor específico en el medio de la región exponencial de amplificación. los niveles de expresión génica relativa se calcularon utilizando el método comparativo Ct. Brevemente, para cada muestra de ADNc, el valor de control endógeno Ct se restó del gen de interés Ct para dar el valor delta Ct ( $\Delta$ Ct). La cantidad normalizada de objetivo se calculó como  $2^{-\Delta$ Ct, suponiendo amplificación para ser de eficiencia al 100%. Los datos finales se expresaron en relación a una muestra del calibrador.

## Resultados

La **Figura 9** muestra el análisis FACS de células de por ciento positivas que expresan receptor de superficie CXCR4 después del tratamiento con varios inhibidores de GSK3. Dos concentraciones de cada compuesto, que van desde 1 µM y 5 µM, se muestran con relación a una población sin tratar de células (control negativo) o células tratadas con activina A y Wnt3 (control positivo). La **Figura 10 paneles a, b, y c** muestran datos de PCR en tiempo real para CXCR4, Sox17, y HNF3beta, que también se considera que son marcadores endodérmicos definitivos. Tanto análisis FACS como PCR en tiempo real demuestran un aumento significativo en cada uno de estos marcadores observados en células diferenciadas respecto a las células de control sin tratar. Los niveles de expresión de estos marcadores endodérmicos definitivos fueron equivalentes en algunos casos con el control positivo, lo que demuestra que un inhibidor de GSK-3 puede sustituir por Wnt3a en esta etapa de diferenciación.

## Ejemplo de referencia 9 Efectos de inhibidores de enzima GSK-3β en la formación del endodermo pancreático

Era importante demostrar que el tratamiento con inhibidores de GSK-3β durante la inducción de endodermo definitivo no impidió la diferenciación subsiguiente de otros tipos de células, tales como endodermo pancreático, por ejemplo. Un subconjunto seleccionado de los resultados se examinó por su capacidad para promover la expresión de PDX1 y HNF6, factores de transcripción clave asociados con endodermo pancreático.

Se llevó a cabo el mantenimiento de células madre embrionarias humanas (líneas H1 y H9) como se describe en el **Ejemplo 1**. Las colonias de células se mantuvieron en un estado indiferenciado, pluripotente con el paso, en

promedio, cada cuatro días. El paso se realizó mediante la exposición de cultivos de células a una solución de colagenasa (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) durante 10 a 30 minutos a 37°C, seguido por raspado suave con una punta de pipeta para recuperar grupos de células. Las agrupaciones se dejan sedimentar por gravedad, seguido de lavado para eliminar la colagenasa residual. Grupos de células se dividieron en una relación 1: 3 para el cultivo de mantenimiento de rutina o una relación 1: 1 para el ensayo subsiguiente. Las líneas de célula madre embrionaria humana utilizadas se mantuvieron a menos que el paso 50 y se evalúan de forma rutinaria para el fenotipo de cariotipo normal y ausencia de contaminación por micoplasma.

*Preparación de células de ensayo:* Agrupaciones celulares de la línea de células madre embrionarias humanas H1 utilizadas en el ensayo se volvieron a suspender uniformemente en medio de cultivo y se colocaron en placas de 24 pocillos revestidas en MATRIGEL™ (1:30 dilución) (pocillo negro; Arctic White) en volúmenes de 1 ml/pocillo. Medio acondicionado MEF suplementado con 8ng/ml de bFGF se utilizó para la siembra inicial y la expansión. En un segundo experimento, grupos de células hES de la línea H9 se sembraron en placas de 96 pocillos en capas de alimentador embrionario de ratón (MEF), previamente inactivadas por tratamiento con mitomicina C (Sigma Chemical Co). El medio de cultivo para las células hES en monocapas MEF consistía en DMEM:F12 con 20% Knockout Serum Replacer (Invitrogen) suplementado con aminoácidos esenciales mínimos (Invitrogen), L-glutamina, y 2-mercaptoetanol. La alimentación diaria se llevó a cabo mediante la aspiración de medio de cultivo gastado de cada pocillo y la sustitución con un volumen igual de medio fresco. Se permitió que los cultivos se expandieran uno a tres días después de la siembra antes de iniciar el ensayo. Las placas se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante la duración del ensayo.

*Reparación de compuestos y medio de ensayo:* Un subconjunto de ocho resultados resultantes de cribado primario se usó para el estudio de seguimiento y ensayos secundarios posteriores. Los compuestos puros se solubilizaron como reservas de 10mM en DMSO y se almacenaron desecados a -20°C hasta su uso. Inmediatamente antes del ensayo, las reservas de compuestos se diluyeron a una concentración final que oscila entre 1µM y 5µM en medio de base con aditivos.

*Ensayo:* En este ensayo, los inhibidores de GSK3 se incluyeron sólo en los días 1 y 2 de la etapa de diferenciación endodérmica definitiva, sustituyendo para Wnt3a. Se iniciaron cultivos de células madre embrionarias en MATRIGEL™ como se describe en los **Ejemplos de Referencia 7 y 8** anteriormente mediante la aspiración de medio de cultivo de las monocapas de células en cada pocillo, seguido de tres lavados en PBS para eliminar los factores de crecimiento residuales y suero. Para la diferenciación de endodermo definitivo, los volúmenes de ensayo (0,5 ml por pocillo para placas de 24 pocillos, 100 µl por pocillo para placas de 96 pocillos) se añadieron conteniendo medio DMEM:F12 con) 0,5% de FCS y diferentes concentraciones de compuestos inhibidores con 100 ng/ml de Activina A, sin Wnt3a. Los pocillos de control positivos contenían el mismo medio de base con 0,5% de FCS y con 100ng/ml de Activina A y 20ng/ml de Wnt3a (R&D Biosystems) en ausencia de compuesto de ensayo. Pocillos de control negativo contenían el mismo medio de base con 0,5% de FCS, en ausencia de Activina A, Wnt3a, o compuesto de ensayo. Pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron de nuevo con concentraciones idénticas del compuesto de prueba o soluciones de control en el día 2 de ensayo. En los días 3 y 4, todos los pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron con DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml activina A en ausencia tanto de compuesto de ensayo como Wnt3a. Pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en los días 3 y 4 en medio de base DMEM:F12 con FCS al 2%. Para la diferenciación de endodermo pancreático, las células fueron tratadas durante tres días, la alimentación diaria con medio de base DMEM:F12 que contiene FCS al 2% con 0,25 µM KAAD ciclopamina (EMD Biosciences) y 20 ng/ml FGF7 (R&D Biosystems). Las células se trataron después durante un período adicional de cuatro días, la alimentación diaria con DMEM:F12 que contenía 1% de B27 (Invitrogen), 0,25 µM KAAD ciclopamina, 2 µM de ácido retinoico (RA; Sigma-Aldrich) y 20 ng/ml FGF7. Pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en medio de base DMEM:F12 con FCS al 2% (etapa 2) o 1% de B27 (etapa 3) y sin otros aditivos.

Cultivos paralelos de células embrionarias humanas H9 fueron cultivados en capas alimentadoras MEF, y diferenciados a endodermo pancreático. La diferenciación endodérmica definitiva se consiguió cultivando las células en medio que consistía en RPMI-1640 (Invitrogen) que no contenía suero en el día 1 y 0,2% de FCS en los días 2 y 3 junto con diferentes concentraciones de compuestos inhibidores y 100 ng/ml de activina A. Pocillos de control positivo contenían el mismo medio de base (con o sin suero) con 100ng/ml de activina A y 20ng/ml Wnt3a (R&D Biosystems) en ausencia de compuesto de ensayo. Pocillos de control negativo contenían el mismo medio de base con o sin suero, en ausencia de activina A, Wnt3a, o compuesto de ensayo. Pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron de nuevo con concentraciones idénticas del compuesto de prueba o soluciones de control en el día 2 de ensayo. En el día 3, todos los pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron con RPMI 1640 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml de activina A en ausencia tanto de compuesto de ensayo como Wnt3a. Pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en el día 3 en medio de base RPMI-1640 con FCS al 2%. Las células se diferencian en endodermo pancreático mediante el tratamiento de las células durante cuatro días, la alimentación diaria con medio de base de RPMI-1640 que contiene FCS al 2% con 0,25 mM KAAD de ciclopamina (EMD Biosciences) y 50 ng/ml FGF10 (R&D Biosystems). Posteriormente, las células se trataron durante tres días de duración, la alimentación diaria con RPMI-1640 que contiene 1% de B27 (Invitrogen), 0,25 mM KAAD de ciclopamina, 2 mM de ácido retinoico (RA; Sigma-Aldrich) y 50 ng/ml FGF10. Pocillos de control negativo paralelos

se mantuvieron en medio base RPMT-1640 con 2% de FCS (etapa 2) o 1% de B27 (etapa 3) y sin otros aditivos.

*Evaluación de ensayo.* Al final de la diferenciación, las células se examinaron como se describe en el **Ejemplo de referencia 8** para la expresión génica mediante PCR en tiempo real. Para una alta tinción de fluorescencia de contenido, las células en placas de 96 pocillos se lavaron dos veces con PBS luego se fijaron con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron tres veces más con PBS, y después se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación y permeabilización, las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS y se bloquearon con 4% de suero de pollo (Invitrogen) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (Pdx-1 antihumano de cabra; Santa Cruz) se diluyó 1: 100 en 4% de suero de pollo y se añadió a las células durante dos horas a temperatura ambiente. Alexa Fluor 488 de anticuerpo secundario conjugado (IgG anti-cabra de pollo; Molecular Probes) se diluyó 1: 200 en PBS y se añadió a cada pocillo después de lavar las células tres veces con PBS. Para contrateñir los núcleos, se añadió 2 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100 µg/pocillo de PBS para visualización.

Las células se visualizaron usando un IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando la dícroico 51008bs para las células teñidas con Hoechst 33342 y Alexa Fluor 488. Los tiempos de exposición fueron optimizados usando pocillos de control positivo y pozos teñidos con anticuerpo secundario solo. Las imágenes de 15 campos por pocillo fueron adquiridas para compensar cualquier pérdida de células durante los procedimientos de tratamiento y tinción. Se obtuvieron mediciones para número total de células y la intensidad total de Pdx-1 para cada pocillo utilizando software IN CELL Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). Se determinó la segmentación para los núcleos sobre la base de los niveles de escala de grises (rango de referencia 100-300) y el tamaño nuclear. Promedios y desviaciones estándar se calcularon para cada conjunto de datos replicado. La expresión de proteína total Pdx-1 se informó como intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula por el área de la células. Los antecedentes fueron eliminados en base a criterios de aceptación de los rangos de escala de grises entre 300 a 3000. Datos totales de intensidad se normalizaron dividiendo las intensidades totales para cada pocillo por la intensidad total media para el control positivo Wnt3a/Activina A. Los datos normalizados se calcularon para las medias y las desviaciones estándar para cada conjunto de duplicados.

Las células para la PCR cuantitativa se lisaron en tampón RLT (Qiagen) y luego se procesaron para extracción de ARN, purificación, y la síntesis a ADNc. Las muestras de ARN se purificaron mediante la unión a una membrana de gel de sílice (RNeasy Mini Kit, Qiagen, CA) en presencia de un tampón que contiene etanol, de alta sal seguido de lavado para eliminar los contaminantes. El ARN se purificó adicionalmente usando un kit libre de ADN TURBO (Ambion, Inc.), y luego el ARN de alta calidad se eluyó en agua. El rendimiento y la pureza se evaluaron mediante lecturas de A260 y A280 en un espectrofotómetro. Las copias ADNc se hicieron a partir de ARN purificado utilizando un kit de archivo de ADNc de alta capacidad de Applied Biosystems, Inc. (ABI, CA).

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos para amplificación y cuantificación de PCR en tiempo real fueron adquiridos de ABI. Reacciones en tiempo real de PCR se realizaron usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900. TAQMAN UNIVERSAL PCR MASTER MIX se utilizó con 20 ng de ARN transcrita a la inversa en un volumen total de reacción de 20 µl. Cada muestra de ADNc se realizó por duplicado para corregir los errores de pipeteo. Los cebadores y sondas TAQMAN etiquetados por FAM se utilizaron a concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión de cada gen diana se normalizó usando un control endógeno de deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato humana (GAPDH) previamente desarrollada por ABI. El cebador y conjuntos de sonda se enumeran del siguiente modo: PDX1 (Hs00236830\_ml), GAPDH (4310884E), y HNF6 (Hs00413554\_ml).

Después de una incubación inicial a 50°C durante 2 min seguida de 95°C durante 10 min, las muestras se sometieron a ciclos 40 veces en dos etapas, una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos seguido por una etapa de recocido/extensión a 60°C para 1 min. El análisis de datos se realizó utilizando el software de sistema de detección de secuencias GENEAMPÒ7000. Para cada conjunto de cebador/sonda, un valor Ct se determinó como el ciclo en el cual la intensidad de la fluorescencia alcanzó un valor específico en el medio de la región exponencial de amplificación. Niveles de expresión génica relativa se calcularon usando el método comparativo Ct. Brevemente, para cada muestra de ADNc, el valor Ct de control endógeno se restó del gen de interés Ct para dar el valor Ct delta ( $\Delta$ Ct). La cantidad normalizada de diana se calculó como  $2^{-\Delta$ Ct}, suponiendo amplificación para ser de eficiencia de 100%. Los datos finales se expresaron en relación a una muestra del calibrador.

## Resultados

Los resultados se muestran para ocho inhibidores de enzima GSK-3 $\beta$ . Los datos presentados en la **Figura 11** de análisis de alto contenido muestran efectos en el número de células (panel A) e intensidad de Pdx1 (panel B) para la línea celular H1 hES, donde se promediaron respectivos puntos de datos a partir de un conjunto de muestras por duplicado y extraídos para cada parámetro de los campos y pozos idénticos. Los datos presentados en la **Figura 12** de PCR en tiempo real muestran efectos de estos inhibidores de moléculas pequeñas sobre la expresión inducida de dos factores de transcripción, Pdx-1 y HNF6. En estos ejemplos, expresión de Pdx-1 y Hnf-6 son indicativos de



diferenciación endodérmica pancreática. Los compuestos de inhibidor GSK-3 $\beta$  en estos ensayos pueden sustituir para Wnt3a durante las primeras etapas de compromiso de linaje de células; células resultantes mantienen una capacidad para formar endodermo pancreático durante las etapas secuenciales posteriores de la diferenciación.

#### 5 **Ejemplo de referencia 10 Efectos de inhibidores de enzima GSK-3 $\beta$ sobre la formación de células pancreáticas endocrinas**

10 Era importante demostrar que el tratamiento con inhibidores de GSK-3 durante la inducción de endodermo definitivo no impidió la diferenciación subsiguiente de otros tipos de células, tales como células endocrinas pancreáticas, o células productoras de insulina, por ejemplo. Un subconjunto selecto de resultados fue examinado por su capacidad para promover la expresión de las hormonas pancreáticas.

15 *Preparación de células para el ensayo:* Las células del endodermo pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo de referencia 9** (cultivados en placas de 96 pocillos y placas de 24 pocillos) se sometieron posteriormente a los agentes que causan que las células se diferencien en células que expresan hormonas pancreáticas.

20 Se inició el ensayo para cultivos de la línea de embriones humanos H1 de células madre en MATRIGEL™ como se describió en los **Ejemplos de Referencia 7 - 9** anteriormente por medio de cultivo de aspiración de monocapas de células en cada pocillo, seguido de tres lavados en PBS para eliminar los factores de crecimiento residuales y suero. Para la diferenciación de endodermo definitivo, los volúmenes de ensayo (0,5 ml por pocillo para placas de 24 pocillos, 100  $\mu$ l por pocillo para placas de 96 pocillos) se añadieron conteniendo medio con 0,5% de FCS y diferentes concentraciones de compuestos inhibidores con 100 ng/ml de activina A, sin Wnt3a. Los pocillos de control positivo contenían el mismo medio de base y 0,5% de FCS con 100ng/ml de activina A y 20ng/ml Wnt3a (R&D Biosystems) en ausencia de compuesto de ensayo. Pocillos de control negativo contenían el mismo medio de base con 0,5% de FCS, en ausencia de activina A, Wnt3a, o compuesto de ensayo. Pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron de nuevo con concentraciones idénticas del compuesto de prueba o soluciones de control en el día 2 de ensayo. En los días 3, 4 y 5, todos los pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron con DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml de activina A en ausencia tanto de compuesto de ensayo como Wnt3a. Pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en los días 3, 4 y 5 en medio de base DMEM:F12 con FCS al 2%. Para la diferenciación de endodermo pancreático, las células fueron tratadas durante tres días, la alimentación diaria con medio de base DMEM:F12 que contiene FCS al 2% con 0,25  $\mu$ M KAAD ciclopamina (EMD Biosciences) y 20 ng/ml FGF7 (R&D Biosystems). Las células se trataron a continuación durante cuatro días, la alimentación diaria con DMEM:F12 que contenía 1% de B27 (Invitrogen), 0,25  $\mu$ M KAAD ciclopamina, 2  $\mu$ M ácido retinoico (RA; Sigma-Aldrich) y 20 ng/ml FGF7. Pocillos de control negativo paralelos durante las etapas 2 y 3 se mantuvieron en medio base DMEM:F12 con 2% de FCS o 1% de B27 y sin cualesquiera otros aditivos. Después de la formación de endodermo pancreático, las células se trataron adicionalmente durante seis días de duración, la alimentación diaria con medio de base DMEM:F12 que contenía 1% de B27 con 1  $\mu$ M DAPT (inhibidor de secretasa gamma: EMD Biosciences) y 50 ng/ml de exendina 4 (Sigma-Aldrich). Las células se trataron entonces para otra duración de tres días, la alimentación diaria con medio de base DMEM:F12 que contenía 1% de B27, 50 ng/ml Exendina 4, 50 ng/ml IGF (R&D Biosystems) y 50 ng/ml de HGF (R&D Biosystems). Pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en medio de base DMEM:F12 con 1% de B27 y sin cualesquiera otros aditivos.

45 *Evaluación de ensayo.* Al final del cultivo, las células se trataron como en los **Ejemplos de Referencia 7 y 8** anteriormente para su evaluación por análisis de alto contenido o PCR en tiempo real.

50 Para una tinción de fluorescencia de alto contenido, las células en placas de 96 pocillos se lavaron dos veces con PBS luego se fijaron con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron tres veces más con PBS, y después se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación y permeabilización, las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS y se bloquearon con suero de pollo al 4% (Invitrogen) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (insulina anti-cerdo de conejillo de indias, reactividad cruzada con la insulina humana; DakoCytomation) se diluyó 1: 500 en el 4% de suero de cabra y se añadió a las células durante una hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS y después se tiñeron con Alexa Fluor 488 de anticuerpo secundario conjugado (IgG anticobaya de cabra; Molecular Probes) diluido 1: 100 en 4% de suero de cabra. Para contrateñir los núcleos, se añadió 2 $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100  $\mu$ l/pocillo de PBS para visualización.

60 Las células se visualizaron usando un IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando el dicroico 51008bs para las células teñidas con Hoechst 33342 y Alexa Fluor 488. Los tiempos de exposición fueron optimizados usando pocillos de control positivo y pocillos teñidos con anticuerpo secundario solo. Las imágenes de 15 campos por pocillo fueron adquiridas para compensar cualquier pérdida de células durante los procedimientos de tratamiento y tinción. Se obtuvieron mediciones para número total de células y la intensidad total de insulina para cada pocillo utilizando software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). Se determinó la segmentación para los núcleos sobre la base de los niveles de escala de grises (rango de referencia 100-300) y el tamaño nuclear. Promedios y

65

desviaciones estándar se calcularon para cada conjunto de datos replicados. La expresión de proteína total de insulina se informó como intensidad total o la intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la zona de tiempos celulares de la célula. Los antecedentes fueron eliminados en base a criterios de aceptación de los rangos de escala de grises entre 300 a 3000. Los datos de intensidad total se normalizaron dividiendo las intensidades totales para cada pocillo por la intensidad total media para el control positivo Wnt3a/Activina A. Los datos normalizados se calcularon para las medias y las desviaciones estándar para cada conjunto triplicado.

Las células para la PCR cuantitativa se lisaron en tampón RLT (Qiagen) y luego se procesaron para extracción de ARN, purificación, y síntesis a ADNc. Las muestras de ARN se purificaron mediante la unión a una membrana de gel de sílice (RNeasy Mini Kit, Qiagen, CA) en presencia de un tampón que contiene etanol alto en sal seguido de lavado para eliminar los contaminantes. El ARN se purificó adicionalmente usando un kit libre de ADN TURBO (Ambion, NC), y ARN de alta calidad se eluyó en agua. El rendimiento y la pureza se evaluaron mediante lecturas de A260 y A280 en un espectrofotómetro. Copias de ADNc se hicieron a partir de ARN purificado utilizando un Applied Biosystems, Inc. (ABI, CA) de kit de archivo de ADNc de alta capacidad.

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos para amplificación y cuantificación de PCR en tiempo real fueron adquiridos de ABI. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron usando el sistema de detección de secuencias ABT PRISM® 7900. TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA) se utilizó con 20 ng de ARN transcrito inversa en un volumen total de reacción de 20 µl. Cada muestra de ADNc se realizó por duplicado para corregir los errores de pipeteo. Los cebadores y sondas TAQMAN® etiquetadas por FAM se utilizaron a concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión de cada gen diana se normalizó usando un control endógeno de deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato humana (GAPDH) previamente desarrollado por ABI. Los conjuntos de cebador y sonda se enumeran de la siguiente manera: PDX1-(Hs00236830\_m1), insulina (Hs00355773), y GAPDH (4310884E).

Después de una incubación inicial a 50°C durante 2 min seguido de 95°C durante 10 min, las muestras se sometieron a ciclos 40 veces en dos etapas, una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 seg, seguido de una etapa de hibridación/extensión a 60°C durante 1 min. El análisis de datos se realizó utilizando el software de sistema de detección de secuencias GENEAMP®7000. Para cada conjunto de cebador/sonda, un valor  $C_t$  se determinó como el número de ciclo en el cual la intensidad de la fluorescencia alcanzó un valor específico en el medio de la región exponencial de amplificación. Los niveles de expresión génica relativa se calcularon utilizando el método  $C_t$  comparativo. Brevemente, para cada muestra a ADNc, el valor de control  $C_t$  de control endógeno se restó del gen de interés  $C_t$  para dar el valor  $C_t$  delta ( $\Delta C_t$ ). La cantidad normalizada de diana se calculó como  $2^{-\Delta C_t}$ , suponiendo que la amplificación sea eficiente al 100%. Los datos finales se expresaron en relación a una muestra del calibrador.

## Resultados

Los resultados se muestran para ocho inhibidores de enzima GSK-3B. Los datos presentados en la **Figura 13** de la análisis de alto contenido muestran los efectos del compuesto de contenido en el número de células (panel A) y la intensidad de insulina (panel B) para la línea celular H1 hES donde los respectivos puntos de datos se promediaron a partir de un conjunto por triplicado y extraído para cada parámetro de los campos y pocillos idénticos. Los datos presentados en la **Figura 14** de la PCR en tiempo real muestran los efectos del compuesto para Pdx-1 y la insulina. En estos ejemplos, Pdx1 y la expresión de insulina son indicativos de diferenciación endodérmica pancreática y la generación de células positivas hormonales. Los compuestos inhibidores de GSK3β selectivos en estos ensayos pueden sustituir Wnt3a durante las primeras etapas de compromiso de linaje celular y pueden inducir y mantener la formación de células pancreáticas beta durante las etapas secuenciales posteriores de diferenciación, como se desprende tanto de inmunotinción de insulina y PCR en tiempo real.

### Ejemplo de referencia 11 Efectos aditivos de inhibidores de la enzima GSK-3β sobre la formación de células endocrinas pancreáticas

Era importante demostrar que el tratamiento con inhibidores de GSK-3β podría mejorar la diferenciación de las células pancreáticas beta si se añade durante múltiples fases de compromiso de destino celular. Un subconjunto seleccionado de resultados se puso a prueba mediante la adición temporizada secuencial para mejorar la expresión de insulina asociada con células positivas hormonales pancreáticas.

*Preparación de células para el ensayo. Preparación de células para el ensayo.* Células del endodermo pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos descritos en los **Ejemplos 9 y 10** (cultivados en placas 96 pocillos) se sometieron posteriormente a los agentes que causan que las células se diferencian en células que expresan hormonas pancreáticas.

Se inició ensayo para cultivos de la línea de células madre embrionarias humanas en MATRIGEL™ como se describe en los **Ejemplos 7 - 9** anteriormente por medio de cultivo de aspiración de monocapas de células en cada pocillo, seguido de tres lavados en PBS para eliminar los factores de crecimiento residuales y suero. Para la diferenciación de endodermo definitivo, se añadieron los volúmenes de prueba (100 µl por pocillo para placas de 96

pocillos) que contienen medio con 0,5% de FCS y diferentes concentraciones de compuestos inhibidores con 100 ng/ml de activina A, sin Wnt3a. Los pocillos de control positivos contenían el mismo medio de base y 0,5% de FCS con 100ng/ml de Activina A y 20ng/ml Wnt3a (R&D Biosystems) en ausencia de compuesto de ensayo. Pocillos de control negativo contenían el mismo medio de base con 0,5% de FCS, en ausencia de Activina A, Wnt3a, o compuesto de ensayo. Pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron de nuevo con concentraciones idénticas del compuesto de prueba o soluciones de control en el día 2 de ensayo. En los días 3, 4 y 5, todos los pocillos de ensayo se aspiraron y se alimentaron con DMEM:F12 suplementado con 2% de FCS y 100ng/ml de Activina A en ausencia tanto de compuesto de ensayo como Wnt3a. Pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en los días 3, 4 y 5 en medio de base DMEM:F12 con FCS al 2%. Para la diferenciación de endodermo pancreático, las células fueron tratadas durante tres días, la alimentación diaria con medio de base DMEM:F12 que contiene FCS al 2% con 0,25  $\mu$ M KAAD de ciclopamina (EMD Biosciences) y 20 ng/ml FGF7 (R&D Biosystems). Las células se trataron a continuación durante cuatro días, la alimentación diaria con DMEM:F12 que contenía 1% de B27 (Invitrogen), 0,25  $\mu$ M KAAD de ciclopamina, 2  $\mu$ M de ácido retinoico (RA; Sigma-Aldrich) y 20 ng/ml FGF7. Pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en medio de base DMEM:FL2 con 2% de FCS o 1% de B27 y sin cualesquiera otros aditivos. Después de la formación de endodermo pancreático, las células se trataron adicionalmente durante seis días de duración, la alimentación de días que alternan con medio de base DMEM:F12 que contenía 1% de B27 con 1  $\mu$ M DAPT (inhibidor de secretasa gamma: EMD Biosciences) y 50 ng/ml de exendina 4 (Sigma-Aldrich) y 1  $\mu$ M TGFbeta R1 inhibidor II (inhibidor ALKS; EMD Biosciences). Durante este período de seis días, los inhibidores de GSK3 $\beta$  se añadieron de nuevo a los respectivos pocillos, utilizando la misma concentración que el tratamiento previo a la iniciación de la diferenciación. Las células se trataron entonces para otra duración de tres días, la alimentación de días que alternan con medio de base DMEM:F12 que contenía 1% de B27, 50 ng/ml de exendina 4, 50 ng/ml de IGF (R&D Biosystems) y 50 ng/ml de HGF (R+D Biosystems) y 1  $\mu$ M de TGF-beta R1 inhibidor II (inhibidor de ALK5; EMD Biosciences). Durante este período de tres días, los inhibidores de G5K313 se añadieron de nuevo a los respectivos pocillos, utilizando la misma concentración que el tratamiento previo a la iniciación de la diferenciación. Conjuntos paralelos de pocillos de control positivo se trataron en presencia o ausencia de 20ng/ml Wnt3a. Pocillos de control negativo paralelos se mantuvieron en medio de base DMEM:F12 con 1% de B27 y sin cualesquiera otros aditivos.

*Evaluación de ensayo.* Al final del cultivo, las células se trataron como en el **Ejemplo de referencia 10** anterior para su evaluación por alta análisis de contenido.

Para una tinción de fluorescencia de alto contenido, las células en placas de 96 pocillos se lavaron dos veces con PBS luego se fijaron con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron tres veces más con PBS, y después se permeabilizaron con 0,5% de Triton X-100 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación y permeabilización, las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS y se bloquearon con suero de pollo al 4% (Invitrogen) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (insulina de anti-cerdo de cobaya, reactividad cruzada con la insulina humana; DakoCytomation) se diluyó 1: 500 en 4% de suero de cabra y se añadió a las células durante una hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS y después se tiñeron con Alexa Fluor 488 de anticuerpo secundario conjugado (IgG anti-cobaya de cabra; Molecular Probes) diluido 1: 100 en 4% de suero de cabra. Para contrateñir los núcleos, se añadió 2 $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100  $\mu$ l/pocillo de PBS para visualización.

Las células se visualizaron usando un IN CELL Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando la dicroico 51008bs para las células teñidas con Hoechst 33342 y Alexa Fluor 488. tiempos de exposición fueron optimizados usando pocillos de control positivo y pocillos teñidos con anticuerpo secundario solo. Las imágenes de 15 campos por pocillo fueron adquiridas para compensar cualquier pérdida de células durante los procedimientos de tratamiento y tinción. Se obtuvieron mediciones para el número total de células y la intensidad total de insulina para cada pocillo utilizando software IN Cell Developer Toolbox 1,7 (GE Healthcare). Se determinó la segmentación para los núcleos sobre la base de los niveles de escala de grises (rango de referencia 100-300) y el tamaño nuclear. Promedios y desviaciones estándar se calcularon para cada conjunto de datos replicado. La expresión de proteína total de insulina se informó como intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la zona de tiempos celulares de la célula. Los antecedentes fueron eliminados en base a criterios de aceptación de los rangos de escala de grises entre 300 a 3000. Los datos de intensidad totales se normalizaron dividiendo las intensidades totales para cada pocillo por la intensidad total media para el control positivo Wnt3a/Activin A. Los datos normalizados se calcularon para las medias y las desviaciones estándar para cada conjunto triplicado.

## Resultados

Los resultados se muestran para ocho inhibidores de la enzima GSK-3B. Los datos presentados en la **Figura 15** de análisis de alto contenido muestran los efectos del compuesto en el número de células (panel A) y la intensidad de insulina (panel B) para la línea celular H1 hES, donde se promediaron respectivos puntos de datos de un conjunto por triplicado y extraídos para cada parámetro de los campos y pocillos idénticos. En este ejemplo, la expresión de insulina es indicativa de la diferenciación de células pancreáticas positivas hormonales. Los compuestos inhibidores de GSK-3 $\beta$  selectivos en estos ensayos pueden sustituir para Wnt3a durante las primeras etapas de compromiso de

linaje celular y, cuando se añaden en etapas posteriores de la diferenciación, parecen promover una mayor expresión de insulina en relación con una muestra de control positivo.

Tabla Ib: Lista de anticuerpos conjugados secundarios utilizados para FACS y análisis de inmunotinción.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

| <b>Anticuerpo conjugado secundario</b>    | <b>Proveedor</b>            | <b>Dilución</b> |
|---|-----------------------------|-----------------|
| IgG APC anti-ratón de cabra conjugado     | Jackson ImmunoResearch (PA) | 1: 200          |
| IgG PE anti-ratón de cabra conjugado      | Jackson ImmunoResearch (PA) | 1: 200          |
| PE anti-conejo de burro o - APC conjugado | Jackson ImmunoResearch (PA) | 1: 200          |
| PE anti-cabra de burro o - APC conjugado  | Jackson ImmunoResearch (PA) | 1: 200          |
| IgM PE anti-ratón de cabra                | SouthernBiotech (AL)        | 1: 200          |
| IgM PE anti-rata de cabra                 | SouthernBiotech (AL)        | 1: 200          |
| IgG3 PE anti-ratón de cabra               | SouthernBiotech (AL)        | 1: 200          |

Tabla II: Efectos de los inhibidores de actividad enzimática GSK-3B en la viabilidad de las células que expresan marcadores de pluripotencia.

|    | Datos en bruto<br>(duplicado) |             | Promedio | S.D.    | % CV  | % Control |
|----|-------------------------------|-------------|----------|---------|-------|-----------|
| 5  | JNJ5226780                    | 0.785 0.790 | 0.788    | 0.00382 | 0.48  | 94.0      |
|    | JNJ10179026                   | 0.148 0.152 | 0.150    | 0.00247 | 1.65  | 4.8       |
| 10 | JNJ17154215                   | 0.427 0.462 | 0.444    | 0.02496 | 5.62  | 46.0      |
|    | JNJ17205955                   | 0.643 0.638 | 0.641    | 0.00368 | 0.57  | 73.5      |
|    | JNJ180125                     | 0.762 0.762 | 0.762    | 0.00007 | 0.01  | 90.4      |
| 15 | JNJ18157646                   | 0.850 0.824 | 0.837    | 0.01824 | 2.18  | 101.0     |
|    | JNJ19370026                   | 0.911 0.884 | 0.898    | 0.01881 | 2.10  | 109.5     |
|    | JNJ19567340                   | 0.723 0.743 | 0.733    | 0.01421 | 1.94  | 86.4      |
|    | JNJ7830433                    | 0.161 0.169 | 0.165    | 0.00559 | 3.39  | 6.9       |
| 20 | JNJ10179130                   | 0.767 0.789 | 0.778    | 0.01556 | 2.00  | 92.6      |
|    | JNJ17154215                   | 0.512 0.555 | 0.533    | 0.03048 | 5.72  | 58.4      |
|    | JNJ17205955                   | 0.282 0.293 | 0.288    | 0.00792 | 2.75  | 24.1      |
| 25 | JNJ18014061                   | 0.764 0.723 | 0.743    | 0.02892 | 3.89  | 87.9      |
|    | JNJ18157698                   | 0.853 0.858 | 0.855    | 0.00382 | 0.45  | 103.5     |
|    | JNJ19376240                   | 0.832 0.837 | 0.834    | 0.00361 | 0.43  | 100.6     |
|    | JNJ19567405                   | 0.726 0.725 | 0.725    | 0.00042 | 0.06  | 85.3      |
| 30 | JNJ8706646                    | 0.132 0.137 | 0.134    | 0.00368 | 2.74  | 2.6       |
|    | JNJ10182562                   | 0.797 0.793 | 0.795    | 0.00346 | 0.44  | 95.1      |
|    | JNJ17157659                   | 0.776 0.787 | 0.782    | 0.00792 | 1.01  | 93.2      |
| 35 | JNJ17205994                   | 0.164 0.148 | 0.156    | 0.01131 | 7.24  | 5.6       |
|    | JNJ18014074                   | 0.475 0.383 | 0.429    | 0.06548 | 15.26 | 43.8      |
|    | JNJ18157698                   | 0.823 0.774 | 0.798    | 0.03444 | 4.31  | 95.6      |
|    | JNJ19386042                   | 0.781 0.729 | 0.755    | 0.03649 | 4.83  | 89.5      |
| 40 | JNJ19573541                   | 0.143 0.149 | 0.146    | 0.00396 | 2.72  | 4.2       |
|    | JNJ8710481                    | 0.716 0.716 | 0.716    | 0.00014 | 0.02  | 84.1      |
|    | JNJ10182562                   | 0.804 0.802 | 0.803    | 0.00148 | 0.18  | 96.2      |
| 45 | JNJ17163042                   | 0.900 0.877 | 0.888    | 0.01626 | 1.83  | 108.2     |
|    | JNJ17226703                   | 0.824 0.799 | 0.812    | 0.01725 | 2.13  | 97.4      |
|    | JNJ18018338                   | 0.744 0.819 | 0.781    | 0.05261 | 6.73  | 93.2      |
|    | JNJ18157711                   | 0.952 0.966 | 0.959    | 0.00933 | 0.97  | 118.1     |
| 50 | JNJ19410833                   | 0.952 0.919 | 0.935    | 0.02277 | 2.43  | 114.8     |
|    | JNJ19574867                   | 0.776 0.777 | 0.777    | 0.00042 | 0.05  | 92.5      |
|    | JNJ8710481                    | 0.691 0.617 | 0.654    | 0.05254 | 8.03  | 75.4      |
|    | JNJ10184655                   | 0.162 0.134 | 0.148    | 0.02022 | 13.66 | 4.5       |
| 55 | JNJ10166565                   | 0.791 0.608 | 0.700    | 0.12947 | 18.50 | 81.8      |
|    | JNJ17982133                   | 0.153 0.129 | 0.141    | 0.01676 | 11.87 | 3.5       |
|    | JNJ18018351                   | 0.731 0.585 | 0.658    | 0.10317 | 15.68 | 75.9      |
| 60 | DMSO                          | 0.789 0.700 | 0.744    | 0.06279 | 8.44  | 88.0      |
|    | JNJ19410859                   | 0.909 0.675 | 0.792    | 0.16546 | 20.88 | 94.7      |
|    | JNJ19574880                   | 0.164 0.151 | 0.157    | 0.00926 | 5.89  | 5.8       |
| 65 | JNJ10148307                   | 0.706 0.672 | 0.689    | 0.02404 | 3.49  | 83.9      |

ES 2 656 265 T3

(continuación)

|    |             |       |       |       |         |       |       |
|----|-------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|
| 5  | JNJ10222784 | 0.641 | 0.601 | 0.621 | 0.02878 | 4.63  | 73.7  |
|    | JNJ17174664 | 0.882 | 0.748 | 0.815 | 0.09504 | 11.66 | 102.5 |
|    | JNJ17989049 | 0.822 | 0.802 | 0.812 | 0.01400 | 1.72  | 102.1 |
|    | JNJ18047991 | 0.777 | 0.764 | 0.771 | 0.00919 | 1.19  | 95.9  |
| 10 | DMSO        | 0.798 | 0.771 | 0.785 | 0.01916 | 2.44  | 98.0  |
|    | JNJ19410872 | 0.791 | 0.789 | 0.790 | 0.00134 | 0.17  | 98.7  |
|    | JNJ20948798 | 0.628 | 0.640 | 0.634 | 0.00806 | 1.27  | 75.6  |
|    | JNJ10164830 | 0.149 | 0.135 | 0.142 | 0.00969 | 6.81  | 2.7   |
| 15 | JNJ10222927 | 0.803 | 0.782 | 0.792 | 0.01492 | 1.88  | 99.1  |
|    | JNJ17187027 | 0.125 | 0.129 | 0.127 | 0.00318 | 2.51  | 0.4   |
|    | JNJ17994873 | 0.315 | 0.542 | 0.428 | 0.15995 | 37.34 | 45.2  |
|    | JNJ18055726 | 0.820 | 0.748 | 0.784 | 0.05091 | 6.49  | 97.9  |
| 20 | JNJ18157711 | 0.154 | 0.165 | 0.160 | 0.00806 | 5.05  | 5.3   |
|    | JNJ19558929 | 0.737 | 0.730 | 0.734 | 0.00481 | 0.66  | 90.4  |
|    | JNJ21192730 | 0.659 | 0.647 | 0.653 | 0.00813 | 1.25  | 78.5  |
|    | JNJ10164895 | 0.165 | 0.154 | 0.159 | 0.00785 | 4.93  | 5.2   |
| 25 | JNJ10231273 | 0.637 | 0.554 | 0.595 | 0.05876 | 9.87  | 69.9  |
|    | JNJ17187053 | 0.684 | 0.588 | 0.636 | 0.06809 | 10.71 | 76.0  |
|    | JNJ17994899 | 0.750 | 0.624 | 0.687 | 0.08945 | 13.02 | 83.5  |
|    | JNJ18077800 | 0.678 | 0.618 | 0.648 | 0.04285 | 6.61  | 77.8  |
| 30 | JNJ19363357 | 0.777 | 0.667 | 0.722 | 0.07757 | 10.74 | 88.7  |
|    | DMSO        | 0.799 | 0.649 | 0.724 | 0.10564 | 14.59 | 89.0  |
|    | JNJ21194667 | 0.648 | 0.625 | 0.636 | 0.01662 | 2.61  | 76.0  |
| 35 | JNJ10172058 | 0.601 | 0.620 | 0.611 | 0.01308 | 2.14  | 72.2  |
|    | JNJ10259847 | 0.695 | 0.702 | 0.698 | 0.00552 | 0.79  | 85.2  |
|    | JNJ17193774 | 0.568 | 0.709 | 0.639 | 0.09956 | 15.59 | 76.4  |
|    | JNJ17994912 | 0.623 | 0.765 | 0.694 | 0.10041 | 14.46 | 84.6  |
| 40 | JNJ18157074 | 0.758 | 0.762 | 0.760 | 0.00297 | 0.39  | 94.3  |
|    | JNJ19369233 | 0.487 | 0.434 | 0.461 | 0.03769 | 8.18  | 49.9  |
|    | JNJ19567314 | 0.690 | 0.686 | 0.688 | 0.00262 | 0.38  | 83.7  |
|    | JNJ21196227 | 0.535 | 0.550 | 0.543 | 0.01089 | 2.01  | 62.1  |
| 45 | JNJ10178727 | 0.743 | 0.638 | 0.691 | 0.07446 | 10.78 | 84.1  |
|    | JNJ10259847 | 0.694 | 0.603 | 0.649 | 0.06449 | 9.94  | 77.8  |
|    | JNJ17200976 | 0.160 | 0.186 | 0.173 | 0.01824 | 10.56 | 7.2   |
| 50 | JNJ17994925 | 0.662 | 0.566 | 0.614 | 0.06788 | 11.05 | 72.7  |
|    | JNJ18157087 | 0.600 | 0.514 | 0.557 | 0.06102 | 10.96 | 64.2  |
|    | JNJ19369246 | 0.685 | 0.524 | 0.605 | 0.11427 | 18.90 | 71.3  |
|    | JNJ19567327 | 0.731 | 0.525 | 0.628 | 0.14552 | 23.18 | 74.7  |
| 55 | JNJ24843611 | 0.715 | 0.596 | 0.655 | 0.08436 | 12.87 | 78.8  |
|    | JNJ24843611 | 0.592 | 0.572 | 0.582 | 0.01393 | 2.39  | 70.0  |
|    | JNJ25758785 | 0.614 | 0.611 | 0.613 | 0.00177 | 0.29  | 74.6  |
|    | JNJ26064571 | 0.766 | 0.849 | 0.807 | 0.05869 | 7.27  | 104.3 |
| 60 | JNJ26130403 | 0.830 | 0.813 | 0.822 | 0.01195 | 1.45  | 106.5 |
|    | JNJ26170794 | 0.727 | 0.730 | 0.728 | 0.00198 | 0.27  | 92.2  |
|    | JNJ26241774 | 0.713 | 0.836 | 0.774 | 0.08733 | 11.28 | 99.3  |
|    | JNJ26367991 | 0.726 | 0.719 | 0.722 | 0.00523 | 0.72  | 91.3  |
| 65 | JNJ26483310 | 0.646 | 0.681 | 0.663 | 0.02510 | 3.78  | 82.4  |

ES 2 656 265 T3

(continuación)

|    |             |       |       |       |         |       |       |
|----|-------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|
|    | JNJ24326185 | 0.651 | 0.649 | 0.650 | 0.00120 | 0.19  | 80.3  |
| 5  | JNJ25758850 | 0.642 | 0.622 | 0.632 | 0.01407 | 2.23  | 77.5  |
|    | JNJ26067626 | 0.843 | 0.672 | 0.758 | 0.12099 | 15.97 | 96.7  |
|    | JNJ26134771 | 0.734 | 0.815 | 0.774 | 0.05728 | 7.40  | 99.3  |
|    | JNJ26170820 | 0.823 | 0.743 | 0.783 | 0.05699 | 7.28  | 100.6 |
| 10 | JNJ26241917 | 0.871 | 0.874 | 0.872 | 0.00219 | 0.25  | 114.2 |
|    | JNJ26714220 | 0.652 | 0.642 | 0.647 | 0.00721 | 1.12  | 79.8  |
|    | JNJ26483223 | 0.617 | 0.633 | 0.625 | 0.01174 | 1.88  | 76.5  |
|    | JNJ24843572 | 0.657 | 0.655 | 0.656 | 0.00134 | 0.20  | 81.2  |
| 15 | JNJ25758863 | 0.684 | 0.809 | 0.746 | 0.08803 | 11.80 | 95.0  |
|    | JNJ26067652 | 0.901 | 0.735 | 0.818 | 0.11731 | 14.34 | 106.0 |
|    | JNJ26150202 | 0.791 | 0.768 | 0.779 | 0.01591 | 2.04  | 100.1 |
|    | JNJ26170833 | 0.948 | 0.764 | 0.856 | 0.12982 | 15.17 | 111.7 |
| 20 | JNJ26243204 | 0.821 | 0.608 | 0.714 | 0.15033 | 21.05 | 90.1  |
|    | JNJ26399906 | 0.745 | 0.685 | 0.715 | 0.04243 | 5.94  | 90.2  |
|    | JNJ26483236 | 0.624 | 0.618 | 0.621 | 0.00417 | 0.67  | 76.0  |
|    | JNJ24843585 | 0.652 | 0.624 | 0.638 | 0.01916 | 3.00  | 78.5  |
| 25 | JNJ25873419 | 0.773 | 0.662 | 0.718 | 0.07792 | 10.86 | 90.6  |
|    | JNJ26069901 | 0.856 | 0.834 | 0.845 | 0.01570 | 1.86  | 110.1 |
|    | JNJ26153647 | 0.828 | 0.800 | 0.814 | 0.02008 | 2.47  | 105.4 |
| 30 | JNJ26177086 | 0.821 | 0.841 | 0.831 | 0.01421 | 1.71  | 108.0 |
|    | JNJ26247143 | 0.816 | 0.787 | 0.802 | 0.02072 | 2.58  | 103.5 |
|    | JNJ26399906 | 0.744 | 0.737 | 0.741 | 0.00453 | 0.61  | 94.1  |
|    | JNJ26483249 | 0.699 | 0.679 | 0.689 | 0.01464 | 2.12  | 86.3  |
| 35 | JNJ25753520 | 0.186 | 0.208 | 0.197 | 0.01541 | 7.83  | 11.3  |
|    | JNJ25887537 | 0.665 | 0.699 | 0.682 | 0.02432 | 3.57  | 85.2  |
|    | JNJ26077883 | 0.810 | 0.683 | 0.746 | 0.09030 | 12.10 | 95.0  |
|    | JNJ26158015 | 0.141 | 0.162 | 0.151 | 0.01506 | 9.95  | 4.3   |
| 40 | DMSO        | 0.784 | 0.605 | 0.695 | 0.12671 | 18.25 | 87.1  |
|    | JNJ26248729 | 0.726 | 0.590 | 0.658 | 0.09624 | 14.63 | 81.5  |
|    | JNJ26399945 | 0.635 | 0.620 | 0.628 | 0.01068 | 1.70  | 76.9  |
|    | JNJ26483249 | 0.697 | 0.695 | 0.696 | 0.00113 | 0.16  | 87.3  |
| 45 | JNJ25753403 | 0.154 | 0.153 | 0.154 | 0.00042 | 0.28  | 4.5   |
|    | JNJ25900641 | 0.616 | 0.645 | 0.630 | 0.02072 | 3.29  | 82.1  |
|    | JNJ22791671 | 0.909 | 0.830 | 0.869 | 0.05614 | 6.46  | 121.0 |
| 50 | JNJ26158054 | 0.150 | 0.150 | 0.150 | 0.00028 | 0.19  | 3.9   |
|    | JNJ26177762 | 0.981 | 1.056 | 1.018 | 0.05303 | 5.21  | 145.3 |
|    | JNJ26261105 | 0.166 | 0.189 | 0.177 | 0.01626 | 9.19  | 8.3   |
|    | JNJ26399971 | 0.718 | 0.451 | 0.584 | 0.18887 | 32.34 | 74.6  |
| 55 | JNJ26483262 | 0.652 | 0.647 | 0.649 | 0.00389 | 0.60  | 85.2  |
|    | JNJ25757173 | 0.503 | 0.529 | 0.516 | 0.01860 | 3.61  | 63.5  |
|    | JNJ25900654 | 0.603 | 0.609 | 0.606 | 0.00424 | 0.70  | 78.1  |
|    | JNJ26116922 | 0.856 | 0.793 | 0.824 | 0.04419 | 5.36  | 113.7 |
| 60 | JNJ26893438 | 0.883 | 0.848 | 0.866 | 0.02503 | 2.89  | 120.5 |
|    | JNJ26184457 | 0.779 | 0.784 | 0.781 | 0.00368 | 0.47  | 106.7 |
|    | JNJ26361712 | 0.892 | 0.914 | 0.903 | 0.01591 | 1.76  | 126.6 |
| 65 | JNJ26399984 | 0.544 | 0.537 | 0.540 | 0.00460 | 0.85  | 67.5  |

ES 2 656 265 T3

(continuación)

|    |             |       |       |       |         |       |       |
|----|-------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|
|    | JNJ26511901 | 0.532 | 0.682 | 0.607 | 0.10543 | 17.37 | 78.3  |
| 5  | JNJ25757173 | 0.665 | 0.645 | 0.655 | 0.01400 | 2.14  | 86.1  |
|    | JNJ25900706 | 0.676 | 0.677 | 0.677 | 0.00035 | 0.05  | 89.7  |
|    | JNJ26120601 | 0.935 | 0.807 | 0.871 | 0.09115 | 10.47 | 121.3 |
|    | JNJ26158093 | 0.916 | 0.859 | 0.887 | 0.03981 | 4.49  | 124.0 |
| 10 | JNJ26219050 | 0.907 | 0.891 | 0.899 | 0.01124 | 1.25  | 125.9 |
|    | JNJ26361725 | 0.909 | 0.896 | 0.902 | 0.00919 | 1.02  | 126.4 |
|    | JNJ26399997 | 0.682 | 0.797 | 0.740 | 0.08118 | 10.98 | 99.9  |
| 15 | JNJ26511927 | 0.679 | 0.644 | 0.661 | 0.02510 | 3.80  | 87.2  |
|    | JNJ25757238 | 0.300 | 0.223 | 0.261 | 0.05452 | 20.88 | 22.0  |
|    | JNJ26047723 | 0.183 | 0.175 | 0.179 | 0.00573 | 3.20  | 8.6   |
|    | JNJ26120614 | 0.741 | 0.728 | 0.734 | 0.00884 | 1.20  | 99.1  |
| 20 | JNJ26158106 | 0.935 | 0.906 | 0.921 | 0.02051 | 2.23  | 129.4 |
|    | JNJ26219063 | 0.131 | 0.128 | 0.129 | 0.00212 | 1.64  | 0.5   |
|    | JNJ26366730 | 0.138 | 0.137 | 0.138 | 0.00092 | 0.67  | 1.9   |
|    | JNJ26400049 | 0.241 | 0.227 | 0.234 | 0.01032 | 4.41  | 17.6  |
| 25 | JNJ26941226 | 0.604 | 0.639 | 0.622 | 0.02475 | 3.98  | 80.7  |
|    | JNJ25758707 | 0.247 | 0.182 | 0.215 | 0.04617 | 21.52 | 14.4  |
|    | JNJ26054912 | 0.659 | 0.634 | 0.647 | 0.01718 | 2.66  | 84.8  |
|    | JNJ26128726 | 0.758 | 0.575 | 0.667 | 0.12961 | 19.44 | 88.1  |
| 30 | JNJ26161343 | 0.166 | 0.170 | 0.168 | 0.00276 | 1.64  | 6.9   |
|    | JNJ26220454 | 0.651 | 0.559 | 0.605 | 0.06541 | 10.81 | 78.0  |
|    | JNJ26367991 | 0.803 | 0.694 | 0.748 | 0.07693 | 10.28 | 101.3 |
| 35 | JNJ26483197 | 0.823 | 0.634 | 0.728 | 0.13378 | 18.37 | 98.1  |
|    | JNJ26511953 | 0.624 | 0.618 | 0.621 | 0.00431 | 0.69  | 80.6  |
|    | RWJ351001   | 0.639 | 0.603 | 0.621 | 0.02553 | 4.11  | 73.6  |
| 40 | RWJ382867   | 0.143 | 0.149 | 0.146 | 0.00403 | 2.76  | 2.9   |
|    | RWJ682205   | 0.817 | 0.818 | 0.818 | 0.00071 | 0.09  | 102.8 |
|    | RWJ665862   | 0.742 | 0.752 | 0.747 | 0.00679 | 0.91  | 92.2  |
|    | RWJ670804   | 0.856 | 0.905 | 0.881 | 0.03479 | 3.95  | 112.1 |
| 45 | RWJ673829   | 0.650 | 0.576 | 0.613 | 0.05268 | 8.59  | 72.4  |
|    | RWJ675260   | 0.768 | 0.724 | 0.746 | 0.03097 | 4.15  | 92.2  |
|    | RWJ675946   | 0.556 | 0.549 | 0.553 | 0.00537 | 0.97  | 63.4  |
|    | RWJ351958   | 0.227 | 0.242 | 0.235 | 0.01103 | 4.70  | 16.1  |
| 50 | RWJ395477   | 0.634 | 0.663 | 0.649 | 0.02044 | 3.15  | 77.7  |
|    | RWJ447228   | 0.141 | 0.128 | 0.135 | 0.00919 | 6.83  | 1.3   |
|    | RWJ666167   | 0.847 | 0.832 | 0.840 | 0.01110 | 1.32  | 106.0 |
|    | RWJ670908   | 0.803 | 0.845 | 0.824 | 0.02998 | 3.64  | 103.7 |
| 55 | RWJ673830   | 0.860 | 0.860 | 0.860 | 0.00035 | 0.04  | 109.1 |
|    | RWJ675261   | 0.528 | 0.497 | 0.513 | 0.02227 | 4.34  | 57.5  |
|    | RWJ675948   | 0.683 | 0.688 | 0.686 | 0.00332 | 0.48  | 83.1  |
|    | RWJ447228   | 0.611 | 0.628 | 0.620 | 0.01202 | 1.94  | 73.3  |
| 60 | RWJ414342   | 0.719 | 0.749 | 0.734 | 0.02143 | 2.92  | 90.3  |
|    | RWJ553709   | 0.916 | 0.838 | 0.877 | 0.05487 | 6.26  | 111.6 |
|    | RWJ666168   | 0.771 | 0.740 | 0.755 | 0.02178 | 2.88  | 93.5  |
| 65 | RWJ670984   | 0.820 | 0.852 | 0.836 | 0.02305 | 2.76  | 105.5 |
|    | RWJ674239   | 0.971 | 0.913 | 0.942 | 0.04137 | 4.39  | 121.2 |



ES 2 656 265 T3

(continuación)

|    |           |       |       |       |         |        |       |
|----|-----------|-------|-------|-------|---------|--------|-------|
|    | RWJ675430 | 0.839 | 0.743 | 0.791 | 0.06746 | 8.53   | 98.8  |
| 5  | RWJ676061 | 0.562 | 0.527 | 0.544 | 0.02440 | 4.48   | 62.2  |
|    | RWJ352190 | 0.678 | 0.661 | 0.670 | 0.01195 | 1.78   | 80.8  |
|    | RWJ414984 | 0.722 | 0.713 | 0.717 | 0.00658 | 0.92   | 87.9  |
|    | RWJ659780 | 0.802 | 0.801 | 0.802 | 0.00106 | 0.13   | 100.4 |
| 10 | RWJ666205 | 0.854 | 0.857 | 0.855 | 0.00205 | 0.24   | 108.4 |
|    | RWJ671232 | 0.767 | 0.798 | 0.782 | 0.02157 | 2.76   | 97.5  |
|    | RWJ674240 | 0.789 | 0.776 | 0.782 | 0.00870 | 1.11   | 97.5  |
|    | RWJ675266 | 0.720 | 0.709 | 0.714 | 0.00764 | 1.07   | 87.4  |
| 15 | RWJ676085 | 0.641 | 0.618 | 0.630 | 0.01619 | 2.57   | 74.9  |
|    | RWJ352244 | 0.603 | 0.584 | 0.593 | 0.01372 | 2.31   | 69.4  |
|    | RWJ425264 | 0.135 | 0.158 | 0.146 | 0.01633 | 11.18  | 3.0   |
| 20 | RWJ662440 | 0.792 | 0.572 | 0.682 | 0.15563 | 22.83  | 82.6  |
|    | RWJ666213 | 0.752 | 0.593 | 0.673 | 0.11292 | 16.79  | 81.2  |
|    | RWJ672667 | 0.805 | 0.598 | 0.702 | 0.14644 | 20.87  | 85.5  |
|    | RWJ674241 | 0.599 | 0.504 | 0.552 | 0.06682 | 12.11  | 63.2  |
| 25 | RWJ675366 | 0.714 | 0.593 | 0.654 | 0.08549 | 13.08  | 78.4  |
|    | RWJ676137 | 0.699 | 0.698 | 0.698 | 0.00099 | 0.14   | 85.0  |
|    | RWJ352628 | 0.690 | 0.674 | 0.682 | 0.01131 | 1.66   | 83.3  |
|    | RWJ425268 | 0.616 | 0.634 | 0.625 | 0.01301 | 2.08   | 74.8  |
| 30 | RWJ663860 | 0.809 | 0.817 | 0.813 | 0.00552 | 0.68   | 103.0 |
|    | RWJ667045 | 0.128 | 0.133 | 0.131 | 0.00361 | 2.76   | 0.7   |
|    | RWJ672932 | 0.821 | 0.811 | 0.816 | 0.00721 | 0.88   | 103.4 |
|    | RWJ674320 | 0.456 | 0.474 | 0.465 | 0.01223 | 2.63   | 50.8  |
| 35 | RWJ675369 | 0.762 | 0.766 | 0.764 | 0.00304 | 0.40   | 95.7  |
|    | RWJ676139 | 0.680 | 0.663 | 0.671 | 0.01195 | 1.78   | 81.8  |
|    | RWJ353258 | 0.615 | 0.635 | 0.625 | 0.01400 | 2.24   | 74.8  |
| 40 | RWJ355923 | 0.681 | 0.698 | 0.689 | 0.01266 | 1.84   | 84.5  |
|    | RWJ664545 | 0.830 | 0.807 | 0.818 | 0.01584 | 1.94   | 103.8 |
|    | RWJ667046 | 0.869 | 0.849 | 0.859 | 0.01442 | 1.68   | 109.9 |
|    | RWJ672934 | 0.821 | 0.841 | 0.831 | 0.01428 | 1.72   | 105.7 |
| 45 | RWJ674817 | 0.819 | 0.840 | 0.830 | 0.01485 | 1.79   | 105.5 |
|    | RWJ675430 | 0.795 | 0.793 | 0.794 | 0.00078 | 0.10   | 100.1 |
|    | RWJ676431 | 0.640 | 0.636 | 0.638 | 0.00283 | 0.44   | 76.7  |
|    | RWJ355131 | 0.610 | 0.628 | 0.619 | 0.01266 | 2.05   | 73.9  |
| 50 | RWJ425271 | 0.143 | 0.144 | 0.144 | 0.00035 | 0.25   | 2.6   |
|    | RWJ353709 | 0.804 | 0.903 | 0.853 | 0.07000 | 8.20   | 109.0 |
|    | RWJ667069 | 0.918 | 0.854 | 0.886 | 0.04483 | 5.06   | 113.9 |
| 55 | RWJ673313 | 0.105 | 1.080 | 0.593 | 0.68971 | 116.37 | 70.0  |
|    | RWJ674855 | 0.877 | 0.860 | 0.868 | 0.01209 | 1.39   | 111.3 |
|    | RWJ675578 | 0.808 | 0.695 | 0.751 | 0.07941 | 10.57  | 93.8  |
|    | RWJ676432 | 0.720 | 0.697 | 0.709 | 0.01648 | 2.33   | 87.3  |
| 60 | RWJ355923 | 0.636 | 0.621 | 0.629 | 0.01054 | 1.68   | 75.4  |
|    | RWJ425348 | 0.640 | 0.634 | 0.637 | 0.00474 | 0.74   | 76.6  |
|    | RWJ665436 | 0.833 | 0.833 | 0.833 | 0.00000 | 0.00   | 106.0 |
|    | RWJ669182 | 0.887 | 0.846 | 0.866 | 0.02934 | 3.39   | 111.0 |
| 65 | RWJ673515 | 0.845 | 0.877 | 0.861 | 0.02326 | 2.70   | 110.2 |

ES 2 656 265 T3

(continuación)

|    |             |       |       |       |         |       |       |
|----|-------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|
| 5  | RWJ674855   | 0.794 | 0.784 | 0.789 | 0.00686 | 0.87  | 99.4  |
|    | RWJ675605   | 0.770 | 0.786 | 0.778 | 0.01138 | 1.46  | 97.8  |
|    | RWJ67657    | 0.629 | 0.659 | 0.644 | 0.02128 | 3.30  | 77.7  |
|    | RWJ356205   | 0.584 | 0.558 | 0.571 | 0.01817 | 3.18  | 66.8  |
|    | RWJ445224   | 0.707 | 0.679 | 0.693 | 0.01987 | 2.87  | 85.0  |
| 10 | RWJ665588   | 0.727 | 0.578 | 0.652 | 0.10536 | 16.15 | 78.9  |
|    | RWJ669327   | 0.742 | 0.629 | 0.685 | 0.07969 | 11.63 | 83.8  |
|    | DMSO        | 0.653 | 0.507 | 0.580 | 0.10310 | 17.78 | 68.0  |
|    | RWJ675104   | 0.722 | 0.568 | 0.645 | 0.10904 | 16.90 | 77.9  |
| 15 | RWJ675881   | 0.643 | 0.581 | 0.612 | 0.04384 | 7.16  | 72.9  |
|    | RWJ676639   | 0.608 | 0.590 | 0.599 | 0.01245 | 2.08  | 70.9  |
|    | JNJ26511966 | 0.597 | 0.610 | 0.603 | 0.00926 | 1.54  | 71.2  |
| 20 | JNJ26511979 | 0.687 | 0.668 | 0.677 | 0.01336 | 1.97  | 82.4  |
|    | JNJ26512005 | 0.840 | 0.832 | 0.836 | 0.00594 | 0.71  | 106.1 |
|    | JNJ26533065 | 0.831 | 0.822 | 0.826 | 0.00587 | 0.71  | 104.7 |
|    | JNJ26533091 | 0.863 | 0.856 | 0.860 | 0.00509 | 0.59  | 109.7 |
| 25 | JNJ26533104 | 0.886 | 0.802 | 0.844 | 0.05954 | 7.05  | 107.3 |
|    | JNJ26533156 | 0.753 | 0.687 | 0.720 | 0.04660 | 6.47  | 88.8  |
|    | JNJ26714181 | 0.455 | 0.463 | 0.459 | 0.00587 | 1.28  | 49.6  |
|    | JNJ26714194 | 0.668 | 0.678 | 0.673 | 0.00764 | 1.13  | 81.7  |
| 30 | JNJ26714207 | 0.181 | 0.171 | 0.176 | 0.00658 | 3.74  | 7.2   |
|    | JNJ26714220 | 0.832 | 0.842 | 0.837 | 0.00658 | 0.79  | 106.3 |
|    | JNJ26875563 | 0.795 | 0.802 | 0.798 | 0.00445 | 0.56  | 100.5 |
|    | JNJ22791671 | 0.157 | 0.140 | 0.148 | 0.01202 | 8.11  | 3.0   |
| 35 | JNJ26893438 | 0.153 | 0.153 | 0.153 | 0.00035 | 0.23  | 3.7   |
|    | JNJ26941226 | 0.168 | 0.154 | 0.161 | 0.00969 | 6.02  | 4.9   |
|    | JNJ28572128 | 0.670 | 0.641 | 0.655 | 0.02079 | 3.17  | 79.1  |
|    | RWJ67694    | 0.706 | 0.679 | 0.693 | 0.01888 | 2.73  | 84.7  |
| 40 | RWJ676940   | 0.788 | 0.666 | 0.727 | 0.08627 | 11.86 | 89.8  |
|    | RWJ677545   | 0.879 | 0.785 | 0.832 | 0.06640 | 7.98  | 105.6 |
|    | RWJ678986   | 0.168 | 0.176 | 0.172 | 0.00537 | 3.13  | 6.6   |
|    | RWJ680665   | 0.946 | 0.848 | 0.897 | 0.06972 | 7.77  | 115.3 |
| 45 | RWJ680667   | 0.187 | 0.202 | 0.194 | 0.01089 | 5.61  | 9.9   |
|    | RWJ680668   | 0.906 | 0.688 | 0.797 | 0.15394 | 19.31 | 100.3 |
|    | RWJ680669   | 0.715 | 0.674 | 0.694 | 0.02850 | 4.10  | 84.9  |
|    | RWJ680858   | 0.695 | 0.700 | 0.697 | 0.00339 | 0.49  | 85.3  |
| 50 | RWJ680858   | 0.665 | 0.631 | 0.648 | 0.02369 | 3.66  | 78.0  |
|    | RWJ680879   | 0.590 | 0.613 | 0.601 | 0.01655 | 2.75  | 71.0  |
|    | RWJ680885   | 0.681 | 0.687 | 0.684 | 0.00382 | 0.56  | 83.3  |
|    | RWJ680991   | 0.829 | 0.821 | 0.825 | 0.00530 | 0.64  | 104.5 |
| 55 | RWJ680992   | 0.822 | 0.790 | 0.806 | 0.02270 | 2.82  | 101.6 |
|    | RWJ680993   | 0.671 | 0.684 | 0.677 | 0.00912 | 1.35  | 82.3  |
|    | RWJ681140   | 0.686 | 0.668 | 0.677 | 0.01266 | 1.87  | 82.3  |
|    | RWJ681142   | 0.212 | 0.197 | 0.204 | 0.01047 | 5.12  | 11.5  |
| 60 | RWJ681146   | 0.666 | 0.666 | 0.666 | 0.00007 | 0.01  | 80.7  |
|    | RWJ681945   | 0.736 | 0.656 | 0.696 | 0.05643 | 8.11  | 85.1  |
|    | RWJ68198    | 0.726 | 0.610 | 0.668 | 0.08217 | 12.30 | 81.0  |
| 65 |             |       |       |       |         |       |       |

(continuación)

|   |             |       |       |       |         |       |      |
|---|-------------|-------|-------|-------|---------|-------|------|
| 5 | JNJ28850601 | 0.303 | 0.310 | 0.306 | 0.00488 | 1.59  | 26.7 |
|   | DMSO        | 0.786 | 0.659 | 0.722 | 0.09001 | 12.46 | 89.1 |
|   | DMSO        | 0.673 | 0.649 | 0.661 | 0.01676 | 2.53  | 79.9 |
|   | DMSO        | 0.701 | 0.686 | 0.693 | 0.01011 | 1.46  | 84.8 |

10 Tabla III: Efectos de los inhibidores de actividad enzimática GSK-3B en la viabilidad de las células que expresan marcadores de pluripotencia.

| 15 |                                | Conc. de comp. (uM) | Datos en bruto (duplicado) | Promedio | S.D.   | % CV | % Control |
|----|--------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|--------|------|-----------|
|    | Medio EXPRES 01 no tratamiento |                     | 0.6379 0.6180              | 0.6280   | 0.0141 | 2.2  | 74.6      |
|    |                                |                     | 0.7412 0.7038              | 0.7225   | 0.0264 | 3.7  | 88.7      |
|    | AA solo                        |                     | 0.7674 0.8047              | 0.7861   | 0.0264 | 3.4  | 98.3      |
| 20 | AA + Wnt3a                     |                     | 0.7754 0.8200              | 0.7977   | 0.0315 | 4.0  | 100.0     |
|    | JNJ26512005                    | 10                  | 0.1412 0.1515              | 0.1464   | 0.0073 | 5.0  | 2.4       |
|    | JNJ26512005                    | 5                   | 0.1501 0.1444              | 0.1473   | 0.0040 | 2.7  | 2.5       |
|    | JNJ26512005                    | 2.5                 | 0.1541 0.4254              | 0.2898   | 0.1918 | 66.2 | 23.9      |
| 25 | JNJ26533065                    | 10                  | 0.1272 0.1282              | 0.1277   | 0.0007 | 0.6  | -0.4      |
|    | JNJ26533065                    | 5                   | 0.5862 0.5880              | 0.5871   | 0.0013 | 0.2  | 68.4      |
|    | JNJ26533065                    | 2.5                 | 0.7613 0.7603              | 0.7608   | 0.0007 | 0.1  | 94.5      |
|    | JNJ26533156                    | 10                  | 0.1481 0.1592              | 0.1537   | 0.0078 | 5.1  | 3.5       |
| 30 | JNJ26533156                    | 5                   | 0.1479 0.1639              | 0.1559   | 0.0113 | 7.3  | 3.8       |
|    | JNJ26533156                    | 2.5                 | 0.2861 0.2477              | 0.2669   | 0.0272 | 10.2 | 20.4      |
|    | JNJ26714194                    | 10                  | 0.2092 0.2426              | 0.2259   | 0.0236 | 10.5 | 14.3      |
|    | JNJ26714194                    | 5                   | 0.6815 0.7128              | 0.6972   | 0.0221 | 3.2  | 84.9      |
| 35 | JNJ26714194                    | 2.5                 | 0.7389 0.7870              | 0.7630   | 0.0340 | 4.5  | 94.8      |
|    | JNJ26150202                    | 10                  | 0.1381 0.1398              | 0.1390   | 0.0012 | 0.9  | 1.3       |
|    | JNJ26150202                    | 5                   | 0.7826 0.7578              | 0.7702   | 0.0175 | 2.3  | 95.9      |
|    | JNJ26150202                    | 2.5                 | 0.8231 0.7742              | 0.7987   | 0.0346 | 4.3  | 100.1     |
| 40 | JNJ26158015                    | 10                  | 0.1352 0.1326              | 0.1339   | 0.0018 | 1.4  | 0.5       |
|    | JNJ26158015                    | 5                   | 0.2632 0.2604              | 0.2618   | 0.0020 | 0.8  | 19.7      |
|    | JNJ26158015                    | 2.5                 | 0.4160 0.5314              | 0.4737   | 0.0816 | 17.2 | 51.4      |
|    | RWJ670804                      | 10                  | 0.4447 0.4791              | 0.4619   | 0.0243 | 5.3  | 49.7      |
| 45 | RWJ670804                      | 5                   | 0.6902 0.6884              | 0.6893   | 0.0013 | 0.2  | 83.8      |
|    | RWJ670804                      | 2.5                 | 0.7476 0.7483              | 0.7480   | 0.0005 | 0.1  | 92.5      |
|    | JNJ26170833                    | 10                  | 0.6790 0.6704              | 0.6747   | 0.0061 | 0.9  | 81.6      |
|    | JNJ26170833                    | 5                   | 0.7833 0.7924              | 0.7879   | 0.0064 | 0.8  | 98.5      |
| 50 | JNJ26170833                    | 2.5                 | 0.8155 0.8389              | 0.8272   | 0.0165 | 2.0  | 104.4     |
|    | JNJ26177086                    | 10                  | 0.6533 0.6884              | 0.6709   | 0.0248 | 3.7  | 81.0      |
|    | JNJ26177086                    | 5                   | 0.7697 0.7738              | 0.7718   | 0.0029 | 0.4  | 96.1      |
|    | JNJ26177086                    | 2.5                 | 0.8119 0.8219              | 0.8169   | 0.0071 | 0.9  | 102.9     |
| 55 | JNJ26177762                    | 10                  | 0.1242 0.1323              | 0.1283   | 0.0057 | 4.5  | -0.4      |
|    | JNJ26177762                    | 5                   | 0.1263 0.1303              | 0.1283   | 0.0028 | 2.2  | -0.3      |
|    | JNJ26177762                    | 2.5                 | 0.8480 0.7725              | 0.8103   | 0.0534 | 6.6  | 101.9     |
|    | RWJ673515                      | 10                  | 0.1695 0.1890              | 0.1793   | 0.0138 | 7.7  | 7.3       |
| 60 | RWJ673515                      | 5                   | 0.7217 0.7435              | 0.7326   | 0.0154 | 2.1  | 90.2      |
|    | RWJ673515                      | 2.5                 | 0.7812 0.7221              | 0.7517   | 0.0418 | 5.6  | 93.1      |
|    | Medio EXPRES 01 no tratamiento |                     | 0.6294 0.6363              | 0.6329   | 0.0049 | 0.8  | 70.3      |
|    |                                |                     | 0.7156 0.7356              | 0.7256   | 0.0141 | 1.9  | 83.3      |
| 65 | AA solo                        |                     | 0.8732 0.9046              | 0.8889   | 0.0222 | 2.5  | 106.0     |
|    | AA + Wnt3a                     |                     | 0.8415 0.8500              | 0.8458   | 0.0060 | 0.7  | 100.0     |

ES 2 656 265 T3

(continuación)

|    |             |     |        |        |        |        |      |       |
|----|-------------|-----|--------|--------|--------|--------|------|-------|
| 5  | JNJ19370026 | 10  | 0.1403 | 0.1493 | 0.1448 | 0.0064 | 4.4  | 2.3   |
|    | JNJ19370026 | 5   | 0.4434 | 0.3878 | 0.4156 | 0.0393 | 9.5  | 40.1  |
|    | JNJ19370026 | 2.5 | 0.7734 | 0.8038 | 0.7886 | 0.0215 | 2.7  | 92.0  |
|    | JNJ26483197 | 10  | 0.2993 | 0.3026 | 0.3010 | 0.0023 | 0.8  | 24.1  |
|    | JNJ26483197 | 5   | 0.7023 | 0.6299 | 0.6661 | 0.0512 | 7.7  | 75.0  |
| 10 | JNJ26483197 | 2.5 | 0.7835 | 0.8043 | 0.7939 | 0.0147 | 1.9  | 92.8  |
|    | RWJ675605   | 10  | 0.7205 | 0.7369 | 0.7287 | 0.0116 | 1.6  | 83.7  |
|    | RWJ675605   | 5   | 0.7769 | 0.8272 | 0.8021 | 0.0356 | 4.4  | 93.9  |
|    | RWJ675605   | 2.5 | 0.8214 | 0.8640 | 0.8427 | 0.0301 | 3.6  | 99.6  |
| 15 | RWJ675430   | 10  | 0.6275 | 0.5980 | 0.6128 | 0.0209 | 3.4  | 67.5  |
|    | RWJ675430   | 5   | 0.7159 | 0.7222 | 0.7191 | 0.0045 | 0.6  | 82.3  |
|    | RWJ675430   | 2.5 | 0.9245 | 0.9403 | 0.9324 | 0.0112 | 1.2  | 112.1 |
|    | RWJ675948   | 10  | 0.7220 | 0.6670 | 0.6945 | 0.0389 | 5.6  | 78.9  |
| 20 | RWJ675948   | 5   | 0.7526 | 0.7486 | 0.7506 | 0.0028 | 0.4  | 86.7  |
|    | RWJ675948   | 2.5 | 0.7557 | 0.7390 | 0.7474 | 0.0118 | 1.6  | 86.3  |
|    | JNJ26483249 | 10  | 0.8214 | 0.8636 | 0.8425 | 0.0298 | 3.5  | 99.5  |
|    | JNJ26483249 | 5   | 0.7996 | 0.7873 | 0.7935 | 0.0087 | 1.1  | 92.7  |
| 25 | JNJ26483249 | 2.5 | 0.8669 | 0.8195 | 0.8432 | 0.0335 | 4.0  | 99.6  |
|    | RWJ67657    | 10  | 0.6195 | 0.5908 | 0.6052 | 0.0203 | 3.4  | 66.5  |
|    | RWJ67657    | 5   | 0.8047 | 0.8319 | 0.8183 | 0.0192 | 2.4  | 96.2  |
|    | RWJ67657    | 2.5 | 0.8041 | 0.7900 | 0.7971 | 0.0100 | 1.3  | 93.2  |
| 30 | RWJ676639   | 10  | 0.1261 | 0.1520 | 0.1391 | 0.0183 | 13.2 | 1.5   |
|    | RWJ676639   | 5   | 0.1303 | 0.1263 | 0.1283 | 0.0028 | 2.2  | 0.0   |
|    | RWJ676639   | 2.5 | 0.4482 | 0.4051 | 0.4267 | 0.0305 | 7.1  | 41.6  |

35

40

45

50

55

60

65

Tabla IV: Efectos de los inhibidores de actividad enzimática GSK-3B en la diferenciación y proliferación de las células madre embrionarias humanas.

| Nombre de compuesto | Respuesta proliferativa |                                  | Expresión SOX-17 |                                  | Proliferative Response |                                  | HNF-3b Expression |                                  |
|---------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|
|                     | Células totales         | Piilegue sobre control Wnt 3a/AA | Intensidad total | Piilegue sobre control Wnt 3a/AA | Células totales        | Piilegue sobre control Wnt 3a/AA | Intensidad total  | Piilegue sobre control Wnt 3a/AA |
| JNJ26511966         | 1723                    | 0.11244207                       | 68870409         | 0.0708                           | 1645                   | 0.10460717                       | 50143628          | 0.0453                           |
| JNJ26511979         | 1110                    | 0.07245904                       | 42978557         | 0.0442                           | 94                     | 0.00597755                       | 0                 | 0.0000                           |
| JNJ26512005         | 7990                    | 0.52154188                       | 339840000        | 0.3494                           | 6833                   | 0.43448539                       | 231745000         | 0.2092                           |
| JNJ26533065         | 4914                    | 0.32074548                       | 238555000        | 0.2453                           | 2907                   | 0.18485899                       | 82808745          | 0.0747                           |
| JNJ26533091         | 3056                    | 0.19945819                       | 153145000        | 0.1575                           | 2643                   | 0.16807097                       | 122246784         | 0.1103                           |
| JNJ26533104         | 3960                    | 0.25850251                       | 47669463         | 0.0490                           | 4641                   | 0.29512575                       | 210730000         | 0.1902                           |
| JNJ26533156         | 12243                   | 0.79917096                       | 699160000        | 0.7189                           | 6536                   | 0.41559887                       | 248855000         | 0.2246                           |
| JNJ26714181         | 401                     | 0.02614400                       | 25580022         | 0.0263                           | 27                     | 0.00168516                       | 0                 | 0.0000                           |
| JNJ26714194         | 7958                    | 0.51948561                       | 351070000        | 0.3610                           | 6992                   | 0.44459636                       | 288075000         | 0.2600                           |
| JNJ26714207         | 277                     | 0.01808212                       | 6558563          | 0.0067                           | 12                     | 0.00073130                       | 535481            | 0.0005                           |
| JNJ26714220         | 1327                    | 0.08662445                       | 69037756         | 0.0710                           | 1194                   | 0.07589584                       | 40478497          | 0.0365                           |
| JNJ26875563         | 791                     | 0.05160259                       | 24732475         | 0.0254                           | 64                     | 0.00406982                       | 1092011           | 0.0010                           |
| JNJ27291671         | 0                       | 0.00000000                       | 0                | 0.0000                           | 3                      | 0.00019077                       | 95784             | 0.0001                           |
| JNJ26893438         | 2                       | 0.00013056                       | 0                | 0.0000                           | 0                      | 0.00000000                       | 0                 | 0.0000                           |
| JNJ26941226         | 6                       | 0.00035903                       | 1092432          | 0.0011                           | 2                      | 0.00009539                       | 150222            | 0.0001                           |
| JNJ28572128         | 2742                    | 0.17899341                       | 122926199        | 0.1264                           | 3166                   | 0.20132905                       | 120729987         | 0.1090                           |
| JNJ28850601         | 33                      | 0.00212155                       | 3855900          | 0.0040                           | 8                      | 0.00050873                       | 208129            | 0.0002                           |
| RWJ674817           | 2000                    | 0.13055682                       | 110080123        | 0.1132                           | 116                    | 0.00737655                       | 4290889           | 0.0039                           |
| RWJ674855           | 3495                    | 0.22814805                       | 110559816        | 0.1137                           | 438                    | 0.02782105                       | 24450647          | 0.0221                           |
| RWJ674855           | 3107                    | 0.20278739                       | 120998421        | 0.1244                           | 6177                   | 0.39276971                       | 273965000         | 0.2473                           |
| RWJ675104           | 658                     | 0.04295320                       | 37841044         | 0.0389                           | 646                    | 0.04107977                       | 31352380          | 0.0283                           |
| RWJ675260           | 5991                    | 0.39108297                       | 252690000        | 0.2598                           | 8479                   | 0.53915615                       | 306520000         | 0.2767                           |
| RWJ675261           | 1953                    | 0.12745610                       | 88653625         | 0.0912                           | 641                    | 0.04076182                       | 18162585          | 0.0164                           |
| RWJ675266           | 2024                    | 0.13209087                       | 128395000        | 0.1320                           | 4923                   | 0.31302661                       | 232020000         | 0.2094                           |
| RWJ675366           | 2979                    | 0.19446439                       | 93454696         | 0.0961                           | 3582                   | 0.22775110                       | 137054653         | 0.1237                           |
| RWJ675369           | 3703                    | 0.24169332                       | 138180000        | 0.1421                           | 3980                   | 0.25306032                       | 139550000         | 0.1260                           |
| RWJ675430           | 21070                   | 1.37538351                       | 1089750000       | 1.1205                           | 21203                  | 1.34831961                       | 1281000000        | 1.1562                           |
| RWJ675578           | 1297                    | 0.08466610                       | 47445962         | 0.0488                           | 30                     | 0.00190773                       | 0                 | 0.0000                           |

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|           |       |            |            |        |       |            |            |        |
|-----------|-------|------------|------------|--------|-------|------------|------------|--------|
| RWJ673605 | 14529 | 0.94839741 | 1013360000 | 1.0419 | 9871  | 0.62767480 | 540725000  | 0.4881 |
| RWJ673881 | 4063  | 0.26522619 | 207891758  | 0.2137 | 3973  | 0.25264697 | 177190000  | 0.1599 |
| RWJ673946 | 1     | 0.00066528 | 0          | 0.0600 | 7     | 0.00041334 | 0          | 0.0000 |
| RWJ673948 | 9716  | 0.63421242 | 572520000  | 0.5887 | 7650  | 0.48643922 | 329425000  | 0.2973 |
| RWJ676061 | 916   | 0.05979503 | 0          | 0.0600 | 1076  | 0.06839210 | 40211776   | 0.0363 |
| RWJ676085 | 738   | 0.04817547 | 30943000   | 0.0318 | 503   | 0.03198626 | 0          | 0.0000 |
| RWJ676137 | 8367  | 0.54618448 | 373185000  | 0.3837 | 7976  | 0.50720168 | 260000000  | 0.2347 |
| RWJ676139 | 20079 | 1.31069260 | 1104750000 | 1.1359 | 16884 | 1.07363836 | 1052345000 | 0.9499 |
| RWJ676431 | 13789 | 0.90012403 | 789085000  | 0.8113 | 11369 | 0.72296588 | 547055000  | 0.4938 |
| RWJ676432 | 16652 | 1.08698348 | 1045395000 | 1.0749 | 14950 | 0.95065340 | 854325000  | 0.7711 |
| RWJ676657 | 6376  | 0.41618252 | 324450000  | 0.3336 | 6058  | 0.38523417 | 260025000  | 0.2428 |
| RWJ676639 | 6470  | 0.42231869 | 327055000  | 0.3363 | 4357  | 0.27706591 | 109160000  | 0.0985 |
| RWJ674817 | 2000  | 0.13055682 | 110080123  | 0.1132 | 116   | 0.00737655 | 4290889    | 0.0039 |
| RWJ674855 | 3495  | 0.22814805 | 110559816  | 0.1137 | 438   | 0.02782105 | 24450647   | 0.0221 |
| RWJ674855 | 3107  | 0.20278739 | 120998421  | 0.1244 | 6177  | 0.39276971 | 273965000  | 0.2473 |
| RWJ675104 | 658   | 0.04295320 | 37841044   | 0.0389 | 646   | 0.04107977 | 31352380   | 0.0283 |
| RWJ675260 | 5991  | 0.39108297 | 252690000  | 0.2598 | 8479  | 0.53915615 | 306520000  | 0.2767 |
| RWJ675261 | 1953  | 0.12745610 | 88653625   | 0.0912 | 641   | 0.04076182 | 18162585   | 0.0164 |
| RWJ675266 | 2024  | 0.13209087 | 128395000  | 0.1320 | 4923  | 0.31302661 | 232020000  | 0.2094 |
| RWJ675366 | 2979  | 0.19446439 | 93454696   | 0.0961 | 3582  | 0.22775110 | 137054653  | 0.1237 |
| RWJ675369 | 3703  | 0.24169332 | 138180000  | 0.1421 | 3980  | 0.25306032 | 139550000  | 0.1260 |
| RWJ675430 | 21070 | 1.37538351 | 1089750000 | 1.1205 | 21203 | 1.34831961 | 1281000000 | 1.1562 |
| RWJ675578 | 1297  | 0.08466610 | 47445962   | 0.0488 | 30    | 0.00190773 | 0          | 0.0000 |
| RWJ673605 | 14529 | 0.94839741 | 1013360000 | 1.0419 | 9871  | 0.62767480 | 540725000  | 0.4881 |
| RWJ673881 | 4063  | 0.26522619 | 207891758  | 0.2137 | 3973  | 0.25264697 | 177190000  | 0.1599 |
| RWJ673946 | 1     | 0.00066528 | 0          | 0.0600 | 7     | 0.00041334 | 0          | 0.0000 |
| RWJ673948 | 9716  | 0.63421242 | 572520000  | 0.5887 | 7650  | 0.48643922 | 329425000  | 0.2973 |
| RWJ676061 | 916   | 0.05979503 | 0          | 0.0600 | 1076  | 0.06839210 | 40211776   | 0.0363 |
| RWJ676085 | 738   | 0.04817547 | 30943000   | 0.0318 | 503   | 0.03198626 | 0          | 0.0000 |
| RWJ676137 | 8367  | 0.54618448 | 373185000  | 0.3837 | 7976  | 0.50720168 | 260000000  | 0.2347 |
| RWJ676139 | 20079 | 1.31069260 | 1104750000 | 1.1359 | 16884 | 1.07363836 | 1052345000 | 0.9499 |
| RWJ676431 | 13789 | 0.90012403 | 789085000  | 0.8113 | 11369 | 0.72296588 | 547055000  | 0.4938 |
| RWJ676432 | 16652 | 1.08698348 | 1045395000 | 1.0749 | 14950 | 0.95065340 | 854325000  | 0.7711 |
| RWJ676657 | 6376  | 0.41618252 | 324450000  | 0.3336 | 6058  | 0.38523417 | 260025000  | 0.2428 |
| RWJ676639 | 6470  | 0.42231869 | 327055000  | 0.3363 | 4357  | 0.27706591 | 109160000  | 0.0985 |
| RWJ674817 | 2000  | 0.13055682 | 110080123  | 0.1132 | 116   | 0.00737655 | 4290889    | 0.0039 |
| RWJ674855 | 3495  | 0.22814805 | 110559816  | 0.1137 | 438   | 0.02782105 | 24450647   | 0.0221 |
| RWJ674855 | 3107  | 0.20278739 | 120998421  | 0.1244 | 6177  | 0.39276971 | 273965000  | 0.2473 |
| RWJ675104 | 658   | 0.04295320 | 37841044   | 0.0389 | 646   | 0.04107977 | 31352380   | 0.0283 |
| RWJ675260 | 5991  | 0.39108297 | 252690000  | 0.2598 | 8479  | 0.53915615 | 306520000  | 0.2767 |
| RWJ675261 | 1953  | 0.12745610 | 88653625   | 0.0912 | 641   | 0.04076182 | 18162585   | 0.0164 |
| RWJ675266 | 2024  | 0.13209087 | 128395000  | 0.1320 | 4923  | 0.31302661 | 232020000  | 0.2094 |
| RWJ675366 | 2979  | 0.19446439 | 93454696   | 0.0961 | 3582  | 0.22775110 | 137054653  | 0.1237 |
| RWJ675369 | 3703  | 0.24169332 | 138180000  | 0.1421 | 3980  | 0.25306032 | 139550000  | 0.1260 |
| RWJ675430 | 21070 | 1.37538351 | 1089750000 | 1.1205 | 21203 | 1.34831961 | 1281000000 | 1.1562 |
| RWJ675578 | 1297  | 0.08466610 | 47445962   | 0.0488 | 30    | 0.00190773 | 0          | 0.0000 |
| RWJ673605 | 14529 | 0.94839741 | 1013360000 | 1.0419 | 9871  | 0.62767480 | 540725000  | 0.4881 |
| RWJ673881 | 4063  | 0.26522619 | 207891758  | 0.2137 | 3973  | 0.25264697 | 177190000  | 0.1599 |
| RWJ673946 | 1     | 0.00066528 | 0          | 0.0600 | 7     | 0.00041334 | 0          | 0.0000 |
| RWJ673948 | 9716  | 0.63421242 | 572520000  | 0.5887 | 7650  | 0.48643922 | 329425000  | 0.2973 |
| RWJ676061 | 916   | 0.05979503 | 0          | 0.0600 | 1076  | 0.06839210 | 40211776   | 0.0363 |
| RWJ676085 | 738   | 0.04817547 | 30943000   | 0.0318 | 503   | 0.03198626 | 0          | 0.0000 |
| RWJ676137 | 8367  | 0.54618448 | 373185000  | 0.3837 | 7976  | 0.50720168 | 260000000  | 0.2347 |
| RWJ676139 | 20079 | 1.31069260 | 1104750000 | 1.1359 | 16884 | 1.07363836 | 1052345000 | 0.9499 |
| RWJ676431 | 13789 | 0.90012403 | 789085000  | 0.8113 | 11369 | 0.72296588 | 547055000  | 0.4938 |
| RWJ676432 | 16652 | 1.08698348 | 1045395000 | 1.0749 | 14950 | 0.95065340 | 854325000  | 0.7711 |
| RWJ676657 | 6376  | 0.41618252 | 324450000  | 0.3336 | 6058  | 0.38523417 | 260025000  | 0.2428 |

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|                |       |            |           |        |          |            |            |        |
|----------------|-------|------------|-----------|--------|----------|------------|------------|--------|
| RWJ676639      | 6470  | 0.42231869 | 327055000 | 0.3363 | 4357     | 0.27706591 | 109160000  | 0.0985 |
| No tratamiento | 3891  | 0.25396566 | 97657703  | 0.1004 | 6091     | 0.38733268 | 109336609  | 0.0987 |
| AA             | 4348  | 0.28379790 | 104735084 | 0.1077 | 122      | 0.00775810 | 5341271    | 0.0048 |
| AA/3a          | 15319 | 1.00000000 | 972595000 | 1.0000 | 15726    | 1.00000000 | 1107900000 | 1.0000 |
| RWJ351001      | 738   | 0.44211577 | 0         | 0.0000 | 0        | 0.00000000 | 0          | 0.0000 |
| RWJ351958      | 0     | 0.00000000 | 0         | 0.0000 | 0        | 0.00000000 | 0          | 0.0000 |
| DMSO           | 56    | 0.03353293 | 454796    | 0.0148 | 211      | 0.16644754 | 4455058    | 0.1626 |
| RWJ352190      | 1313  | 0.78642715 | 28506437  | 0.9266 | 5485     | 4.32684722 | 85245671   | 3.1115 |
| RWJ352244      | 12    | 0.00738523 | 85949     | 0.0028 | 67       | 0.05259006 | 1300640    | 0.0475 |
| RWJ352628      | 2899  | 1.73612774 | 32703235  | 1.0630 | 7460     | 5.88456482 | 149772525  | 5.4668 |
| RWJ353258      | 562   | 0.33632735 | 11388240  | 0.3702 | 787      | 0.62108861 | 10743082   | 0.3921 |
| RWJ355131      | 118   | 0.07045908 | 2574279   | 0.0837 | 57       | 0.04522745 | 2584708    | 0.0943 |
| RWJ355923      | 136   | 0.08163673 | 410648    | 0.0133 | 0        | 0.00000000 | 0          | 0.0000 |
| RWJ356205      | 19    | 0.01137725 | 0         | 0.0000 | 0        | 0.00000000 | 0          | 0.0000 |
| RWJ382867      | 3     | 0.00159681 | 431883    | 0.0140 | 31       | 0.02419143 | 847186     | 0.0309 |
| RWJ395477      | 33    | 0.01976048 | 0         | 0.0000 | 225      | 0.17749145 | 5223879    | 0.1907 |
| RWJ414342      | 16    | 0.00978044 | 0         | 0.0000 | 496      | 0.39127005 | 8966327    | 0.3273 |
| RWJ414984      | 26    | 0.01556886 | 459801    | 0.0149 | 189      | 0.14935577 | 1819533    | 0.0664 |
| RWJ425264      | 1     | 0.00039920 | 0         | 0.0000 | 42       | 0.03339469 | 1605538    | 0.0586 |
| RWJ425268      | 22    | 0.01297405 | 82062     | 0.0027 | 311      | 0.24506968 | 5749996    | 0.2099 |
| RWJ425271      | 0     | 0.00000000 | 0         | 0.0000 | 0        | 0.00000000 | 0          | 0.0000 |
| RWJ425348      | 26    | 0.01556886 | 0         | 0.0000 | 0        | 0.00000000 | 0          | 0.0000 |
| RWJ445224      | 202   | 0.12095808 | 627280    | 0.0204 | 1079     | 0.85143308 | 14326715   | 0.5229 |
| RWJ447228      | 3     | 0.00179641 | 0         | 0.0000 | 4        | 0.00315540 | 101114     | 0.0037 |
| RWJ533709      | 1310  | 0.78423154 | 24382455  | 0.7926 | 3249     | 2.56323955 | 75834631   | 2.7680 |
| RWJ659780      | 20    | 0.01177645 | 0         | 0.0000 | 425      | 0.33526164 | 8880858    | 0.3242 |
| RWJ663860      | 9     | 0.00538922 | 37140     | 0.0012 | 134      | 0.10570602 | 2144545    | 0.0783 |
| RWJ662440      | 7     | 0.00419162 | 48154     | 0.0016 | 5        | 0.00420720 | 170177     | 0.0062 |
| RWJ664545      | 70    | 0.04191617 | 589594    | 0.0192 | 0        | 0.00000000 | 0          | 0.0000 |
| RWJ665436      | 1215  | 0.72774451 | 7568849   | 0.2460 | 0        | 0.00000000 | 0          | 0.0000 |
| No tratamiento | 1145  | 0.68542914 | 6979814   | 0.2269 | not done |            |            |        |
| AA             | 100   | 0.05988024 | 1264807   | 0.0411 | 51       | 0.04049435 | 923625     | 0.0337 |
| AA/3a          | 1670  | 1.00000000 | 30764293  | 1.0000 | 1268     | 1.00000000 | 27396787   | 1.0000 |

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|                  |       |            |           |        |       |             |           |        |        |
|------------------|-------|------------|-----------|--------|-------|-------------|-----------|--------|--------|
| RWJ665588        | 43    | 0.00510815 | 706614    | 0.0055 | 0     | 0.000000000 | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| RWJ665862        | 7     | 0.00079815 | 102445    | 0.0008 | 0     | 0.000000000 | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| RWJ666167        | 46    | 0.00546732 | 0         | 0.0000 | 46    | 0.00548446  | 818478    | 0.0044 | 0.0044 |
| RWJ666168        | 5     | 0.00059861 | 284777    | 0.0022 | 32    | 0.00385502  | 2309043   | 0.0124 | 0.0124 |
| RWJ666205        | 258   | 0.03092825 | 4009395   | 0.0312 | 391   | 0.04665766  | 14340307  | 0.0769 | 0.0769 |
| RWJ666213        | 62    | 0.00742278 | 782261    | 0.0061 | 112   | 0.01335347  | 2792473   | 0.0150 | 0.0150 |
| RWJ667045        | 36    | 0.00431000 | 312039    | 0.0024 | 2     | 0.00027820  | 1731575   | 0.0093 | 0.0093 |
| RWJ667046        | 59    | 0.00702371 | 397711    | 0.0031 | 103   | 0.01232017  | 3561761   | 0.0191 | 0.0191 |
| RWJ667069        | 22    | 0.00267380 | 770128    | 0.0060 | 0     | 0.000000000 | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| RWJ669182        | 77    | 0.00925852 | 1631067   | 0.0127 | 0     | 0.000000000 | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| RWJ669327        | 129   | 0.01540426 | 997629    | 0.0078 | 98    | 0.01164454  | 4138261   | 0.0222 | 0.0222 |
| RWJ670804        | 2386  | 0.28565728 | 20866647  | 0.1625 | 2594  | 0.30931563  | 61161468  | 0.3280 | 0.3280 |
| RWJ670908        | 172   | 0.02063213 | 625299    | 0.0049 | 133   | 0.01589699  | 3578458   | 0.0192 | 0.0192 |
| RWJ670984        | 8     | 0.00099769 | 394948    | 0.0031 | 530   | 0.06319053  | 16678849  | 0.0894 | 0.0894 |
| RWJ671232        | 17    | 0.00207519 | 0         | 0.0000 | 53    | 0.00627931  | 2270954   | 0.0122 | 0.0122 |
| RWJ672667        | 11    | 0.00127704 | 0         | 0.0000 | 36    | 0.00433193  | 2287281   | 0.0123 | 0.0123 |
| RWJ672932        | 2     | 0.00023944 | 0         | 0.0000 | 0     | 0.000000000 | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| RWJ672934        | 174   | 0.02087158 | 1451727   | 0.0113 | 0     | 0.000000000 | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| RWJ673313        | 80    | 0.00961769 | 940367    | 0.0073 | 333   | 0.03970273  | 5586343   | 0.0300 | 0.0300 |
| RWJ673515        | 11886 | 1.42305850 | 223646667 | 1.7415 | 10331 | 1.23173834  | 309900000 | 1.6618 | 1.6618 |
| RWJ673829        | 545   | 0.06524862 | 5849381   | 0.0455 | 404   | 0.04820761  | 6738305   | 0.0361 | 0.0361 |
| RWJ673830        | 10    | 0.00115732 | 315367    | 0.0025 | 35    | 0.00421270  | 3072013   | 0.0165 | 0.0165 |
| RWJ674239        | 2473  | 0.29603320 | 80676667  | 0.6282 | 4209  | 0.50182815  | 143916667 | 0.7718 | 0.7718 |
| RWJ674240        | 8     | 0.00091787 | 233687    | 0.0018 | 6     | 0.00071536  | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| RWJ674241        | 1     | 0.00007981 | 1309298   | 0.0102 | 0     | 0.000000000 | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| RWJ674320        | 0     | 0.00003991 | 0         | 0.0000 | 0     | 0.000000000 | 0         | 0.0000 | 0.0000 |
| No tratamiento   | 7653  | 0.91619443 | 26272707  | 0.2046 | 12050 | 1.43665050  | 74453588  | 0.3993 | 0.3993 |
| AA               | 15    | 0.00175593 | 0         | 0.0000 | 210   | 0.02503776  | 3777945   | 0.0203 | 0.0203 |
| AA/3a            | 8353  | 1.00000000 | 128424304 | 1.0000 | 8387  | 1.000000000 | 186480000 | 1.0000 | 1.0000 |
| RWJ355923        | 7319  | 0.91843393 | 387695000 | 1.0342 | 5436  | 1.07644321  | 437495000 | 0.9520 | 0.9520 |
| RWJ664545        | 6620  | 0.83065629 | 333205000 | 0.8889 | 4767  | 0.94395485  | 397435000 | 0.8649 | 0.8649 |
| RWJ353709        | 6217  | 0.78014807 | 337920000 | 0.9014 | 5013  | 0.99277156  | 437235000 | 0.9515 | 0.9515 |
| Comp. referencia | 5934  | 0.74463546 | 363935000 | 0.9708 | 4122  | 0.81621943  | 348135000 | 0.7576 | 0.7576 |



5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|                |              |            |           |        |              |            |           |        |
|----------------|--------------|------------|-----------|--------|--------------|------------|-----------|--------|
| JNJ18157698    | 10447        | 1.31089221 | 382680000 | 1.0208 | 6908         | 1.36805624 | 560475000 | 1.2196 |
| JNJ5226780     | 10963        | 1.37570586 | 296920000 | 0.7921 | 5679         | 1.12456679 | 463525000 | 1.0087 |
| JNJ7830433     | 1766         | 0.22160873 | 162790000 | 0.4343 | 2184         | 0.43241905 | 189875000 | 0.4132 |
| JNJ8706646     | 2914         | 0.36566696 | 230965000 | 0.6161 | 2776         | 0.54975740 | 125125000 | 0.2723 |
| JNJ8710481     | 3600         | 0.45175053 | 276080000 | 0.7365 | 4121         | 0.81612041 | 294665000 | 0.6412 |
| JNJ8710481     | 1977         | 0.24808633 | 164760000 | 0.4395 | 2266         | 0.44865828 | 152060000 | 0.3309 |
| JNJ10148307    | 9964.5       | 1.25040783 | 363855000 | 0.9706 | 9728         | 1.92642836 | 635655000 | 1.3832 |
| JNJ10164830    | 2536.5       | 0.31829590 | 179185000 | 0.4780 | 2397         | 0.47460145 | 150600000 | 0.3277 |
| JNJ10164895    | 5706.5       | 0.71608734 | 319930000 | 0.8534 | 5096         | 1.00920883 | 341360000 | 0.7428 |
| JNJ10172058    | 4645.5       | 0.58294642 | 257295000 | 0.6864 | 4507         | 0.89256362 | 312605000 | 0.6803 |
| JNJ10178727    | 2892.5       | 0.36296900 | 213165000 | 0.5686 | 3043         | 0.60253490 | 269570000 | 0.5866 |
| JNJ10179026    | 2460.5       | 0.30875894 | 203350000 | 0.5425 | 2410         | 0.47727498 | 209795000 | 0.4565 |
| JNJ10179130    | 4783         | 0.60020078 | 306085000 | 0.8165 | 4556         | 0.90226755 | 326475000 | 0.7104 |
| JNJ10182562    | 6916.5       | 0.86792571 | 377885000 | 1.0080 | 4504         | 0.89196950 | 365090000 | 0.7945 |
| JNJ10182562    | 7370.5       | 0.92489647 | 365075000 | 0.9739 | 5300         | 1.04950985 | 399265000 | 0.8688 |
| JNJ10184655    | 10533        | 1.32174677 | 475250000 | 1.2678 | 5186         | 1.02693336 | 404710000 | 0.8807 |
| JNJ10222784    | 3513         | 0.44083323 | 242750000 | 0.6476 | 2522         | 0.49945539 | 214575000 | 0.4669 |
| No tratamiento | no realizado |            |           |        | no realizado |            |           |        |
| AA             | no realizado |            |           |        | no realizado |            |           |        |
| AA/3a          | 7969         | 1.00000000 | 374870000 | 1.0000 | 5050         | 1.00000000 | 459540000 | 1.0000 |
| JNJ10222784    | 563          | 0.31250000 | 57351132  | 0.3295 | 1744         | 0.03386884 | 165365000 | 1.1010 |
| JNJ10222927    | 158          | 0.08777778 | 14786632  | 0.0850 | 83           | 0.00161234 | 14201404  | 0.0946 |
| JNJ10231273    | 3            | 0.00166667 | 0         | 0.0000 | 4            | 0.00007770 | 28439     | 0.0002 |
| JNJ10259847    | 5            | 0.00277778 | 0         | 0.0000 | 10           | 0.00019426 | 0         | 0.0000 |
| JNJ10259847    | 15           | 0.00805556 | 54892     | 0.0032 | 0            | 0.00000000 | 0         | 0.0000 |
| JNJ17154215    | 24           | 0.01305556 | 689535    | 0.0040 | 11           | 0.00021368 | 0         | 0.0000 |
| JNJ17154215    | 94           | 0.05194444 | 11142426  | 0.0640 | 12           | 0.00022340 | 1767033   | 0.0118 |
| JNJ17157659    | 15           | 0.00805556 | 0         | 0.0000 | 21           | 0.00039823 | 4567590   | 0.0304 |
| JNJ17163042    | 33           | 0.01805556 | 2188847   | 0.0126 | 69           | 0.00134038 | 13689421  | 0.0911 |
| JNJ10166565    | 4            | 0.00194444 | 0         | 0.0000 | 3            | 0.00005828 | 291660    | 0.0019 |
| JNJ17174664    | 88           | 0.04888889 | 7121122   | 0.0409 | 399          | 0.00774117 | 65100086  | 0.4335 |
| JNJ17187027    | 11           | 0.00583333 | 1073763   | 0.0062 | 5            | 0.00008742 | 0         | 0.0000 |
| JNJ17187053    | 8            | 0.00444444 | 0         | 0.0000 | 9            | 0.00016512 | 0         | 0.0000 |

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|                |              |            |           |        |      |            |           |        |
|----------------|--------------|------------|-----------|--------|------|------------|-----------|--------|
| JNJ17193774    | 109          | 0.06027778 | 15714170  | 0.0903 | 136  | 0.00263219 | 15725984  | 0.1047 |
| JNJ17200976    | 5            | 0.00250000 | 125443    | 0.0007 | 5    | 0.00009713 | 0         | 0.0000 |
| JNJ17205955    | 20           | 0.01083333 | 3135653   | 0.0180 | 8    | 0.00015541 | 0         | 0.0000 |
| JNJ17205955    | 9            | 0.00472222 | 72387     | 0.0004 | 17   | 0.00033024 | 736311    | 0.0049 |
| JNJ17205994    | 6            | 0.00305556 | 644015    | 0.0037 | 4    | 0.00007770 | 0         | 0.0000 |
| JNJ17226703    | 77           | 0.04277778 | 12632849  | 0.0726 | 28   | 0.00054392 | 9312311   | 0.0620 |
| JNJ17982133    | 14           | 0.00750000 | 887585    | 0.0051 | 1    | 0.00001943 | 52047     | 0.0003 |
| JNJ17989049    | 23           | 0.01277778 | 2117429   | 0.0122 | 13   | 0.00024282 | 0         | 0.0000 |
| No tratamiento | no realizado |            |           |        | 432  | 0.00838222 | 42987388  | 0.2862 |
| AA             | 147          | 0.08138889 | 20330009  | 0.1168 | 8    | 0.00014569 | 87206     | 0.0006 |
| AA/AA          | 1800         | 1.00000000 | 174052346 | 1.0000 | 1478 | 0.02870158 | 150190000 | 1.0000 |

Tabla V: Efectos de los inhibidores de actividad enzimática GSK-3B en la diferenciación y proliferación de las células madre embrionarias humanas.

| Respuesta proliferativa - Resultados fuertes   |                                | Expresión SOX17 - Resultados fuertes   |                                | Expresión HNF3β - Resultados fuertes   |                                |
|--|--------------------------------|--|--------------------------------|--|--------------------------------|
| Nombre compuesto                               | Plegue sobre Wnt 3a/AA control | Nombre compuesto                       | Plegue sobre Wnt 3a/AA control | Nombre compuesto                       | Plegue sobre Wnt 3a/AA control |
| RWJ352628                                      | 5.8846                         | RWJ673515                              | 1.7415                         | RWJ352628                              | 5.4668                         |
| RWJ352190                                      | 4.3268                         | JNJ10184655                            | 1.2678                         | RWJ352190                              | 3.1115                         |
| RWJ553709                                      | 2.5632                         | Expresión SOX17 - Resultados moderados |                                | RWJ553709                              | 2.7680                         |
| JNJ10148307                                    | 1.9264                         | RWJ676139                              | 1.1359                         | RWJ673515                              | 1.6618                         |
| RWJ673515                                      | 1.4231                         | RWJ675430                              | 1.1205                         | JNJ10148307                            | 1.3832                         |
| JNJ5226780                                     | 1.3757                         | RWJ676432                              | 1.0749                         | JNJ18157698                            | 1.2196                         |
| RWJ675430                                      | 1.3754                         | RWJ352628                              | 1.0630                         | Expresión HNF3β - Resultados moderados |                                |
| JNJ18157698                                    | 1.3681                         | RWJ675605                              | 1.0419                         | RWJ675430                              | 1.1562                         |
| JNJ10184655                                    | 1.3217                         | RWJ355923                              | 1.0342                         | JNJ10222784                            | 1.1010                         |
| RWJ676139                                      | 1.3107                         | JNJ18157698                            | 1.0208                         | JNJ5226780                             | 1.0087                         |
| Respuesta proliferativa - Resultados moderados |                                | JNJ10182562                            | 1.0080                         | RWJ355923                              | 0.9520                         |
| JNJ5226780                                     | 1.1246                         | reference cmpd                         | 0.9708                         | RWJ353709                              | 0.9515                         |
| RWJ676432                                      | 1.0870                         | JNJ10148307                            | 0.9706                         | RWJ676139                              | 0.9499                         |
| RWJ355923                                      | 1.0764                         | RWJ352190                              | 0.9266                         | JNJ10184655                            | 0.8807                         |
| RWJ676139                                      | 1.0736                         | RWJ353709                              | 0.9014                         | JNJ10182562                            | 0.8688                         |
| JNJ10182562                                    | 1.0495                         | RWJ664545                              | 0.8889                         | RWJ664545                              | 0.8649                         |
| JNJ10184655                                    | 1.0269                         | JNJ10164895                            | 0.8534                         | RWJ674239                              | 0.7718                         |
| JNJ10164895                                    | 1.0092                         | JNJ10179130                            | 0.8165                         | RWJ676432                              | 0.7711                         |
| RWJ353709                                      | 0.9928                         | RWJ676431                              | 0.8113                         | reference cmpd                         | 0.7576                         |
| RWJ675605                                      | 0.9484                         | RWJ553709                              | 0.7926                         | JNJ10164895                            | 0.7428                         |
| RWJ664545                                      | 0.9440                         | JNJ5226780                             | 0.7921                         | JNJ10179130                            | 0.7104                         |
| JNJ10182562                                    | 0.9249                         | JNJ6710481                             | 0.7365                         | JNJ10172058                            | 0.6803                         |
| JNJ10179130                                    | 0.9023                         | JNJ26533156                            | 0.7189                         | JNJ6710481                             | 0.6412                         |
| RWJ676431                                      | 0.9001                         | JNJ10172058                            | 0.6864                         | JNJ10178727                            | 0.5866                         |
| JNJ10172058                                    | 0.8926                         | JNJ10222784                            | 0.6476                         |  |                                |
| RWJ445224                                      | 0.8514                         | RWJ674239                              | 0.6282                         |  |                                |
| Comp. referencia                               |                                | JNJ6706646                             | 0.6161                         |  |                                |
| JNJ6710481                                     | 0.8162                         | RWJ675948                              | 0.5887                         |  |                                |
| JNJ26533156                                    | 0.8161                         | JNJ10178727                            | 0.5686                         |  |                                |
| RWJ352190                                      | 0.7992                         |  |                                |  |                                |
| RWJ352190                                      | 0.7864                         |  |                                |  |                                |
| RWJ553709                                      | 0.7842                         |  |                                |  |                                |
| RWJ665436                                      | 0.7277                         |  |                                |  |                                |
| RWJ675948                                      | 0.6342                         |  |                                |  |                                |
| RWJ353258                                      | 0.6211                         |  |                                |  |                                |
| JNJ10178727                                    | 0.6025                         |  |                                |  |                                |

ES 2 656 265 T3

Tabla VI: Efectos de los inhibidores de actividad enzimática GSK-3B en la proliferación de las células madre embrionarias humanas.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

| Nombre JNJ                 | Datos en bruto |        |        | Promedio | S.D.   | % CV  | % Control |
|----------------------------|----------------|--------|--------|----------|--------|-------|-----------|
| <b>Medio acondicionado</b> | 1.1348         | 1.0099 | 1.1092 | 1.0846   | 0.0660 | 6.1   | 116.5     |
| <b>No tratamiento</b>      | 0.9344         | 0.5977 | 0.8454 | 0.7925   | 0.1745 | 22.0  | 85.2      |
| <b>AA/DMSO</b>             | 0.3878         | 0.2434 | 0.2252 | 0.2855   | 0.0891 | 31.2  | 30.7      |
| <b>AA/Wnt3a/DMSO</b>       | 0.6098         | 1.0804 | 0.7635 | 0.8179   | 0.2403 | 25.8  | 100.0     |
| RWJ351001                  | 0.3418         | 0.4276 | 0.5751 | 0.4482   | 0.1180 | 26.3  | 48.2      |
| RWJ351858                  | 0.1362         | 0.1531 | 0.1532 | 0.1475   | 0.0098 | 6.6   | 15.8      |
| RWJ352190                  | 1.3764         | 1.2753 | 1.3208 | 1.3242   | 0.0506 | 3.8   | 142.3     |
| RWJ352244                  | 0.6923         | 0.5994 | 0.6134 | 0.6350   | 0.0501 | 7.9   | 68.2      |
| RWJ352628                  | 1.7896         | 1.4721 | 2.1908 | 1.8175   | 0.3602 | 19.8  | 195.3     |
| RWJ353258                  | 1.7591         | 1.6274 | 1.6518 | 1.6794   | 0.0701 | 4.2   | 180.4     |
| RWJ355131                  | 0.3702         | 0.3193 | 0.3368 | 0.3421   | 0.0259 | 7.6   | 36.8      |
| RWJ355923                  | 0.5876         | 0.6384 | 0.9154 | 0.7138   | 0.1764 | 24.7  | 76.7      |
| RWJ356205                  | 0.3074         | 0.2328 | 0.2920 | 0.2774   | 0.0394 | 14.2  | 29.8      |
| RWJ382867                  | 0.1311         | 0.1245 | 0.1288 | 0.1281   | 0.0034 | 2.6   | 13.8      |
| RWJ395477                  | 0.1270         | 0.2778 | 0.1916 | 0.1988   | 0.0757 | 38.1  | 21.4      |
| RWJ414342                  | 0.2166         | 0.3062 | 0.2915 | 0.2714   | 0.0481 | 17.7  | 29.2      |
| RWJ414984                  | 0.4362         | 0.3728 | 0.2481 | 0.3524   | 0.0957 | 27.2  | 37.9      |
| RWJ425264                  | 0.1560         | 0.1481 | 0.1359 | 0.1467   | 0.0101 | 6.9   | 15.8      |
| RWJ425268                  | 0.2932         | 0.3883 | 0.6258 | 0.4358   | 0.1713 | 39.3  | 46.8      |
| RWJ425271                  | 0.1362         | 0.1479 | 0.1298 | 0.1380   | 0.0092 | 6.7   | 14.8      |
| RWJ425348                  | 0.2198         | 0.2159 | 0.2300 | 0.2219   | 0.0073 | 3.3   | 23.8      |
| RWJ445224                  | 0.7624         | 0.2705 | 0.2478 | 0.4269   | 0.2908 | 68.1  | 45.9      |
| RWJ447228                  | 0.1239         | 0.1233 | 0.1269 | 0.1247   | 0.0019 | 1.5   | 13.4      |
| RWJ553709                  | 0.1277         | 0.1254 | 0.6980 | 0.3170   | 0.3299 | 104.1 | 34.1      |
| RWJ659780                  | 0.2665         | 0.3215 | 0.2605 | 0.2828   | 0.0336 | 11.9  | 30.4      |
| RWJ662440                  | 0.2395         | 0.3235 | 0.1333 | 0.2321   | 0.0953 | 41.1  | 24.9      |
| RWJ663860                  | 0.2646         | 0.1873 | 0.1293 | 0.1937   | 0.0679 | 35.0  | 20.8      |
| RWJ664545                  | 0.3590         | 0.2790 | 0.1515 | 0.2632   | 0.1047 | 39.8  | 28.3      |
| RWJ665436                  | 0.4690         | 0.5805 | 0.3349 | 0.4615   | 0.1230 | 26.6  | 49.6      |
| Nombre JNJ                 | Datos en bruto |        |        | Promedio | S.D.   | % CV  | % Control |
| <b>Medio acondicionado</b> | 1.1525         | 1.1269 | 1.1140 | 1.1311   | 0.0196 | 1.7   | 71.0      |
| <b>No tratamiento</b>      | 1.2057         | 1.2358 | 1.3132 | 1.2516   | 0.0555 | 4.4   | 78.6      |
| <b>AA/DMSO</b>             | 0.2622         | 0.2073 | 0.2830 | 0.2508   | 0.0391 | 15.6  | 15.8      |
| <b>AA/Wnt3a/DMSO</b>       | 1.3943         | 1.7976 | 1.8000 | 1.5922   | 0.2136 | 13.4  | 100.0     |
| RWJ665588                  | 0.1930         | 0.2223 | 0.2167 | 0.2107   | 0.0156 | 7.4   | 13.2      |
| RWJ665862                  | 0.1757         | 0.1813 | 0.1835 | 0.1802   | 0.0040 | 2.2   | 11.3      |
| RWJ666167                  | 0.1473         | 0.1880 | 0.1732 | 0.1695   | 0.0206 | 12.2  | 10.6      |
| RWJ666168                  | 0.1330         | 0.1362 | 0.1867 | 0.1520   | 0.0301 | 19.8  | 9.5       |
| RWJ666205                  | 0.8191         | 0.5493 | 0.6526 | 0.6737   | 0.1361 | 20.2  | 42.3      |
| RWJ666213                  | 0.4008         | 0.2779 | 0.3869 | 0.3552   | 0.0673 | 18.9  | 22.3      |
| RWJ667045                  | 0.1220         | 0.1248 | 0.1251 | 0.1240   | 0.0017 | 1.4   | 7.8       |
| RWJ667046                  | 0.2883         | 0.3308 | 0.5503 | 0.3898   | 0.1406 | 36.1  | 24.5      |
| RWJ667069                  | 0.2835         | 0.4024 | 0.5698 | 0.4186   | 0.1438 | 34.4  | 26.3      |
| RWJ669182                  | 0.3704         | 0.6073 | 0.5280 | 0.5019   | 0.1206 | 24.0  | 31.5      |
| RWJ669327                  | 0.2266         | 0.1815 | 0.2289 | 0.2123   | 0.0267 | 12.6  | 13.3      |

ES 2 656 265 T3

|    |                     |                       |        |        |                 |             |             |                  |
|----|---------------------|-----------------------|--------|--------|-----------------|-------------|-------------|------------------|
|    | RWJ670904           | 1.0820                | 1.1862 | 1.1076 | 1.1253          | 0.0543      | 4.8         | 70.7             |
|    | RWJ670908           | 0.3590                | 0.5457 | 0.6123 | 0.5057          | 0.1313      | 26.0        | 31.8             |
| 5  | RWJ670984           | 0.2198                | 0.3564 | 0.3202 | 0.2988          | 0.0708      | 23.7        | 18.8             |
|    | RWJ671232           | 0.2928                | 0.2920 | 0.3659 | 0.3169          | 0.0424      | 13.4        | 19.9             |
|    | RWJ672667           | 0.3349                | 0.3013 | 0.3507 | 0.3290          | 0.0252      | 7.7         | 20.7             |
|    | RWJ672932           | 0.1852                | 0.1924 | 0.2349 | 0.2042          | 0.0269      | 13.2        | 12.8             |
| 10 | RWJ672934           | 0.2170                | 0.3003 | 0.1877 | 0.2350          | 0.0584      | 24.9        | 14.8             |
|    | RWJ673313           | 0.3094                | 0.2515 | 0.1881 | 0.2497          | 0.0607      | 24.3        | 15.7             |
|    | RWJ673515           | 1.8452                | 1.7710 | 1.5591 | 1.7251          | 0.1485      | 8.6         | 108.3            |
|    | RWJ673829           | 0.7305                | 0.7067 | 0.6250 | 0.6874          | 0.0553      | 8.0         | 43.2             |
| 15 | RWJ673830           | 0.2113                | 0.1800 | 0.1547 | 0.1820          | 0.0284      | 15.6        | 11.4             |
|    | RWJ674239           | 1.5225                | 1.5912 | 0.1081 | 1.0739          | 0.8371      | 78.0        | 67.4             |
|    | RWJ674240           | 0.4006                | 1.2807 | 0.1162 | 0.5992          | 0.6071      | 101.3       | 37.6             |
|    | RWJ674241           | 0.1972                | 0.1839 | 0.1162 | 0.1658          | 0.0434      | 26.2        | 10.4             |
| 20 | RWJ674320           | 0.1351                | 0.1318 | 0.1169 | 0.1279          | 0.0097      | 7.6         | 8.0              |
|    | <b>Nombre JNJ</b>   | <b>Datos en bruto</b> |        |        | <b>Promedio</b> | <b>S.D.</b> | <b>% CV</b> | <b>% Control</b> |
|    | Medio acondicionado | 1.0568                | 1.0604 |        | 1.0586          | 0.0025      | 0.2         | 71.9             |
| 25 | No tratamiento      | 1.1544                | 0.9576 |        | 1.0560          | 0.1392      | 13.2        | 71.7             |
|    | AA solo + DMSO      | 0.6329                | 0.8434 |        | 0.7382          | 0.1488      | 20.2        | 47.1             |
|    | AA + Wnt3a + DMSO   | 1.2704                | 1.8669 |        | 1.4229          | 0.2960      | 20.8        | 100.0            |
| 30 | RWJ674817           | 0.5617                | 0.2098 |        | 0.3858          | 0.2488      | 64.5        | 19.9             |
|    | RWJ674855           | 0.6850                | 0.5853 |        | 0.6352          | 0.0705      | 11.1        | 39.2             |
|    | RWJ674855           | 0.7496                | 0.9187 |        | 0.8342          | 0.1196      | 14.3        | 54.5             |
|    | RWJ675104           | 0.2320                | 0.2124 |        | 0.2222          | 0.0139      | 6.2         | 7.3              |
|    | RWJ675260           | 0.8079                | 1.4391 |        | 1.1235          | 0.4463      | 39.7        | 76.9             |
| 35 | RWJ675261           | 0.8310                | 0.7318 |        | 0.7814          | 0.0701      | 9.0         | 50.5             |
|    | RWJ675266           | 1.0646                | 1.1384 |        | 1.1015          | 0.0522      | 4.7         | 75.2             |
|    | RWJ675366           | 0.6344                | 1.0400 |        | 0.8372          | 0.2868      | 34.3        | 54.8             |
|    | Sin células         | 0.1335                | 0.2070 |        | 0.1703          | 0.0520      | 30.5        | 3.3              |
| 40 | RWJ675369           | 0.8643                | 0.4060 |        | 0.6352          | 0.3241      | 51.0        | 39.2             |
|    | RWJ675430           | 1.7922                | 1.8533 |        | 1.8228          | 0.0432      | 2.4         | 130.9            |
|    | RWJ675578           | 0.1914                | 0.2371 |        | 0.2143          | 0.0323      | 15.1        | 6.7              |
|    | RWJ675605           | 1.8401                | 1.7563 |        | 1.7982          | 0.0593      | 3.3         | 129.0            |
| 45 | RWJ675891           | 1.0301                | 1.0356 |        | 1.0329          | 0.0039      | 0.4         | 69.9             |
|    | RWJ675946           | 0.1306                | 0.1338 |        | 0.1322          | 0.0023      | 1.7         | 0.3              |
|    | RWJ675948           | 1.7143                | 1.6506 |        | 1.6825          | 0.0450      | 2.7         | 120.0            |
|    | RWJ676061           | 0.4170                | 0.4956 |        | 0.4563          | 0.0556      | 12.2        | 25.4             |
| 50 | RWJ676065           | 0.1772                | 0.2348 |        | 0.2060          | 0.0407      | 19.8        | 6.0              |
|    | RWJ676137           | 1.0231                | 1.2392 |        | 1.1312          | 0.1528      | 13.5        | 77.5             |
|    | RWJ676139           | 1.9718                | 2.0997 |        | 2.0358          | 0.0904      | 4.4         | 147.3            |
|    | RWJ676431           | 1.5168                | 1.6872 |        | 1.6020          | 0.1205      | 7.5         | 113.8            |
| 55 | RWJ676432           | 1.6935                | 1.9710 |        | 1.8323          | 0.1962      | 10.7        | 131.6            |
|    | RWJ67657            | 1.2655                | 1.1829 |        | 1.2242          | 0.0584      | 4.8         | 84.7             |
|    | RWJ676639           | 1.3481                | 1.3168 |        | 1.3325          | 0.0221      | 1.7         | 93.0             |
| 60 | JNJ26511966         | 0.6444                | 0.7239 |        | 0.6842          | 0.0562      | 8.2         | 43.0             |
|    | JNJ26511979         | 0.2046                | 0.3076 |        | 0.2561          | 0.0728      | 28.4        | 9.9              |
|    | JNJ26512005         | 1.3627                | 1.0693 |        | 1.2160          | 0.2075      | 17.1        | 84.0             |
|    | JNJ26533065         | 0.8722                | 0.9660 |        | 0.9191          | 0.0663      | 7.2         | 61.1             |
| 65 | JNJ26533091         | 1.0332                | 0.4554 |        | 0.7443          | 0.4086      | 54.9        | 47.6             |
|    | JNJ26533104         | 0.8775                | 0.7347 |        | 0.8061          | 0.1010      | 12.5        | 52.4             |

ES 2 656 265 T3

|    |                     |                       |        |                 |             |             |                  |
|----|---------------------|-----------------------|--------|-----------------|-------------|-------------|------------------|
| 5  | JNJ26533196         | 1.7865                | 1.2008 | 1.4937          | 0.4142      | 27.7        | 105.5            |
|    | JNJ26714181         | 0.2396                | 0.1584 | 0.1990          | 0.0574      | 28.9        | 5.5              |
|    | JNJ26714194         | 0.8122                | 1.0827 | 0.9475          | 0.1913      | 20.2        | 63.3             |
|    | JNJ26714207         | 0.1342                | 0.1363 | 0.1353          | 0.0015      | 1.1         | 0.6              |
|    | JNJ26714220         | 1.0462                | 0.5838 | 0.8150          | 0.3270      | 40.1        | 53.1             |
| 10 | JNJ26875563         | 0.4586                | 0.2903 | 0.3745          | 0.1190      | 31.8        | 19.0             |
|    | JNJ22791671         | 0.1277                | 0.1402 | 0.1340          | 0.0088      | 6.6         | 0.5              |
|    | JNJ26893438         | 0.1258                | 0.1324 | 0.1291          | 0.0047      | 3.6         | 0.1              |
|    | JNJ26941226         | 0.1219                | 0.1216 | 0.1218          | 0.0002      | 0.2         | -0.5             |
| 15 | JNJ28572128         | 0.4223                | 0.4721 | 0.4472          | 0.0352      | 7.9         | 24.7             |
|    | JNJ28850601         | 0.1514                | 0.1396 | 0.1455          | 0.0083      | 5.7         | 1.4              |
|    | <b>Nombre JNJ</b>   | <b>Datos en bruto</b> |        | <b>Promedio</b> | <b>S.D.</b> | <b>% CV</b> | <b>% Control</b> |
| 20 | Medio acondicionado | 0.7423                | 0.7081 | 0.7252          | 0.0242      | 3.3         | 87.7             |
|    | No tratamiento      | 0.4936                | 0.5689 | 0.5313          | 0.0532      | 10.0        | 59.8             |
|    | AA solo + DMSO      | 0.1433                | 0.1939 | 0.1686          | 0.0358      | 21.2        | 7.6              |
|    | AA + Wnt3a + DMSO   | 0.6808                | 0.9406 | 0.8107          | 0.1837      | 22.7        | 100.0            |
| 25 | JNJ17994873         | 0.2447                | 0.1331 | 0.1889          | 0.0789      | 41.8        | 10.6             |
|    | JNJ17994899         | 0.1537                | 0.1302 | 0.1420          | 0.0166      | 11.7        | 3.8              |
|    | no cells            | 0.1163                | 0.1147 | 0.1155          | 0.0011      | 1.0         | 0.0              |
|    | JNJ17994912         | 0.2994                | 0.2592 | 0.2793          | 0.0284      | 10.2        | 23.6             |
|    | JNJ17994925         | 0.1353                | 0.2121 | 0.1737          | 0.0543      | 31.3        | 8.4              |
| 30 | JNJ180125           | 0.1267                | 0.1419 | 0.1343          | 0.0107      | 8.0         | 2.7              |
|    | JNJ18014061         | 0.1376                | 0.1676 | 0.1526          | 0.0212      | 13.9        | 5.3              |
|    | JNJ18014074         | 0.1134                | 0.1103 | 0.1119          | 0.0022      | 2.0         | -0.5             |
|    | JNJ18018338         | 0.1318                | 0.1478 | 0.1398          | 0.0113      | 8.1         | 3.5              |
| 35 | JNJ18018351         | 0.2569                | 0.2124 | 0.2347          | 0.0315      | 13.4        | 17.1             |
|    | JNJ18047991         | 0.2674                | 0.2636 | 0.2655          | 0.0027      | 1.0         | 21.6             |
|    | JNJ18055726         | 0.4357                | 0.3467 | 0.3912          | 0.0629      | 16.1        | 39.7             |
|    | JNJ18077800         | 0.1265                | 0.1588 | 0.1427          | 0.0228      | 16.0        | 3.9              |
| 40 | JNJ18157074         | 0.1662                | 0.2521 | 0.2092          | 0.0607      | 29.0        | 13.5             |
|    | JNJ18157087         | 0.1596                | 0.1566 | 0.1581          | 0.0021      | 1.3         | 6.1              |
|    | JNJ18157646         | 0.2725                | 0.1636 | 0.2181          | 0.0770      | 35.3        | 14.8             |
|    | JNJ18157711         | 1.2256                | 1.0636 | 1.1446          | 0.1146      | 10.0        | 148.0            |
| 45 | JNJ18157711         | 0.1134                | 0.1070 | 0.1102          | 0.0045      | 4.1         | -0.8             |
|    | JNJ19363357         | 0.1469                | 0.1495 | 0.1482          | 0.0018      | 1.2         | 4.7              |
|    | JNJ19369233         | 0.1169                | 0.1122 | 0.1146          | 0.0033      | 2.9         | -0.1             |
|    | JNJ19369246         | 0.1595                | 0.1422 | 0.1509          | 0.0122      | 8.1         | 5.1              |
| 50 | JNJ19370026         | 1.0484                | 1.0749 | 1.0617          | 0.0187      | 1.8         | 136.1            |
|    | JNJ19376240         | 0.3012                | 0.2347 | 0.2680          | 0.0470      | 17.5        | 21.9             |
|    | JNJ19386042         | 0.1267                | 0.1510 | 0.1389          | 0.0172      | 12.4        | 3.4              |
|    | JNJ19410833         | 1.1902                | 1.1487 | 1.1695          | 0.0293      | 2.5         | 151.6            |
| 55 | JNJ19410859         | 0.6400                | 0.7076 | 0.6738          | 0.0478      | 7.1         | 80.3             |
|    | JNJ19410872         | 0.1701                | 0.1752 | 0.1727          | 0.0036      | 2.1         | 8.2              |
|    | JNJ19538929         | 0.3435                | 0.3488 | 0.3462          | 0.0037      | 1.1         | 33.2             |
|    | JNJ19567314         | 0.4032                | 0.3548 | 0.3790          | 0.0342      | 9.0         | 37.9             |
| 60 | JNJ19567327         | 0.1602                | 0.1502 | 0.1552          | 0.0071      | 4.6         | 5.7              |
|    | JNJ19567340         | 0.1604                | 0.2079 | 0.1842          | 0.0336      | 18.2        | 9.9              |
|    | JNJ19567405         | 0.1646                | 0.1592 | 0.1619          | 0.0038      | 2.4         | 6.7              |
|    | JNJ19573541         | 0.1779                | 0.2273 | 0.2026          | 0.0349      | 17.2        | 12.5             |
| 65 | JNJ19574867         | 0.1225                | 0.1443 | 0.1334          | 0.0154      | 11.6        | 2.6              |

ES 2 656 265 T3

|    |                     |                       |        |                 |             |             |                  |
|----|---------------------|-----------------------|--------|-----------------|-------------|-------------|------------------|
| 5  | JNJ19574680         | 0.1300                | 0.1291 | 0.1296          | 0.0006      | 0.5         | 2.0              |
|    | JNJ20948798         | 0.1263                | 0.1336 | 0.1300          | 0.0052      | 4.0         | 2.1              |
|    | JNJ21192730         | 0.2778                | 0.1326 | 0.2052          | 0.1027      | 50.0        | 12.9             |
|    | JNJ21194667         | 0.2569                | 0.1219 | 0.1894          | 0.0955      | 50.4        | 10.6             |
|    | JNJ21196227         | 0.1640                | 0.1158 | 0.1399          | 0.0341      | 24.4        | 3.5              |
|    | JNJ24843611         | 1.1486                | 0.8970 | 1.0228          | 0.1779      | 17.4        | 130.5            |
| 10 | JNJ24843611         | 0.1358                | 0.1201 | 0.1280          | 0.0111      | 8.7         | 1.8              |
|    | JNJ24326185         | 0.1257                | 0.1257 | 0.1257          | 0.0000      | 0.0         | 1.5              |
|    | JNJ24843572         | 0.4676                | 0.4803 | 0.4740          | 0.0090      | 1.9         | 51.6             |
|    | <b>Nombre JNJ</b>   | <b>Datos en bruto</b> |        | <b>Promedio</b> | <b>S.D.</b> | <b>% CV</b> | <b>% Control</b> |
| 15 | Medio acondicionado | 0.6935                | 0.7803 | 0.7369          | 0.0614      | 8.3         | 104.8            |
|    | No tratamiento      | 0.4735                | 0.6069 | 0.5402          | 0.0943      | 17.5        | 71.5             |
|    | AA solo + DMSO      | 0.1428                | 0.1656 | 0.1542          | 0.0161      | 10.5        | 6.3              |
| 20 | AA + Wnt3a + DMSO   | 0.5702                | 0.8468 | 0.7085          | 0.1956      | 27.6        | 100.0            |
|    | JNJ24843585         | 0.1599                | 0.2380 | 0.1990          | 0.0552      | 27.8        | 13.8             |
|    | JNJ25753520         | 0.1287                | 0.1244 | 0.1266          | 0.0030      | 2.4         | 1.6              |
|    | no cells            | 0.1241                | 0.1100 | 0.1171          | 0.0100      | 8.5         | 0.0              |
| 25 | JNJ25753403         | 0.1235                | 0.1152 | 0.1194          | 0.0059      | 4.9         | 0.4              |
|    | JNJ25757173         | 0.1199                | 0.1278 | 0.1239          | 0.0056      | 4.5         | 1.1              |
|    | JNJ25757173         | 0.1174                | 0.1162 | 0.1168          | 0.0008      | 0.7         | -0.1             |
|    | JNJ25757238         | 1.1100                | 0.9464 | 1.0282          | 0.1157      | 11.3        | 154.1            |
| 30 | JNJ25758797         | 0.1247                | 0.1115 | 0.1181          | 0.0093      | 7.9         | 0.2              |
|    | JNJ25758785         | 0.2640                | 0.1688 | 0.2164          | 0.0673      | 31.1        | 16.8             |
|    | JNJ25758850         | 0.2313                | 0.1307 | 0.1810          | 0.0711      | 39.3        | 10.8             |
|    | JNJ25758863         | 0.8639                | 0.9218 | 0.8929          | 0.0409      | 4.6         | 131.2            |
| 35 | JNJ25873419         | 0.2540                | 0.2320 | 0.2430          | 0.0156      | 6.4         | 21.3             |
|    | JNJ25887537         | 0.1809                | 0.3077 | 0.2443          | 0.0897      | 36.7        | 21.5             |
|    | JNJ25900641         | 0.1892                | 0.1872 | 0.1882          | 0.0014      | 0.8         | 12.0             |
|    | JNJ25900654         | 0.1967                | 0.2492 | 0.2230          | 0.0371      | 16.7        | 17.9             |
| 40 | JNJ25900706         | 0.3346                | 0.1619 | 0.2483          | 0.1221      | 49.2        | 22.2             |
|    | JNJ26047723         | 0.1106                | 0.1138 | 0.1122          | 0.0023      | 2.0         | -0.8             |
|    | JNJ26054912         | 0.1224                | 0.1445 | 0.1335          | 0.0156      | 11.7        | 2.8              |
|    | JNJ26064571         | 0.1312                | 0.1270 | 0.1291          | 0.0030      | 2.3         | 2.0              |
| 45 | JNJ26067626         | 0.1653                | 0.2114 | 0.1884          | 0.0326      | 17.3        | 12.0             |
|    | JNJ26067652         | 0.1732                | 0.1467 | 0.1600          | 0.0187      | 11.7        | 7.2              |
|    | JNJ26069901         | 0.1618                | 0.2754 | 0.2186          | 0.0803      | 36.7        | 17.2             |
| 50 | JNJ26077683         | 1.0006                | 0.9631 | 0.9819          | 0.0265      | 2.7         | 146.2            |
|    | JNJ26116922         | 0.6472                | 0.4319 | 0.5396          | 0.1522      | 28.2        | 71.4             |
|    | JNJ26120601         | 0.1539                | 0.1469 | 0.1504          | 0.0049      | 3.3         | 5.6              |
|    | JNJ26120614         | 0.1127                | 0.1309 | 0.1218          | 0.0129      | 10.6        | 0.8              |
| 55 | JNJ26128726         | 0.6887                | 0.5860 | 0.6374          | 0.0726      | 11.4        | 88.0             |
|    | JNJ26130493         | 0.1141                | 0.1094 | 0.1118          | 0.0033      | 3.0         | -0.9             |
|    | JNJ26134771         | 0.2774                | 0.1690 | 0.2232          | 0.0767      | 34.3        | 17.9             |
|    | JNJ26150292         | 0.9482                | 1.1150 | 1.0316          | 0.1179      | 11.4        | 154.6            |
| 60 | JNJ26153647         | 0.7687                | 0.6804 | 0.7246          | 0.0624      | 8.6         | 102.7            |
|    | JNJ26158015         | 0.7125                | 0.3347 | 0.5236          | 0.2671      | 51.0        | 68.7             |
|    | JNJ26158054         | 0.1446                | 0.1221 | 0.1334          | 0.0159      | 11.9        | 2.7              |
|    | JNJ26158093         | 1.0968                | 1.3108 | 1.2038          | 0.1513      | 12.6        | 183.8            |
| 65 | JNJ26158106         | 0.3167                | 0.3415 | 0.3291          | 0.0175      | 5.3         | 35.8             |
|    | JNJ26161343         | 0.1261                | 0.1144 | 0.1203          | 0.0083      | 6.9         | 0.5              |

ES 2 656 265 T3

|    |                     |                       |                 |             |             |                  |
|----|---------------------|-----------------------|-----------------|-------------|-------------|------------------|
|    | JNJ26170794         | 0.2223 0.2930         | 0.2577          | 0.0500      | 19.4        | 23.8             |
|    | JNJ26170820         | 0.1265 0.1236         | 0.1251          | 0.0021      | 1.6         | 1.3              |
| 5  | JNJ26170833         | 1.1940 0.9431         | 1.0686          | 0.1774      | 16.6        | 160.9            |
|    | JNJ26177066         | 1.0689 0.6879         | 0.8784          | 0.2694      | 30.7        | 128.7            |
|    | JNJ26177762         | 1.0444 0.7603         | 0.9024          | 0.2009      | 22.3        | 132.8            |
| 10 | JNJ26184457         | 0.1443 0.1209         | 0.1326          | 0.0165      | 12.5        | 2.6              |
|    | JNJ26219050         | 0.1152 0.1309         | 0.1231          | 0.0111      | 9.0         | 1.0              |
|    | <b>Nombre JNJ</b>   | <b>Datos en bruto</b> | <b>Promedio</b> | <b>S.D.</b> | <b>% CV</b> | <b>% Control</b> |
|    | Medio acondicionado | 0.7590 0.7451         | 0.7521          | 0.0098      | 1.3         | 98.0             |
| 15 | No tratamiento      | 0.5687 0.4490         | 0.5089          | 0.0846      | 16.6        | 60.4             |
|    | AA solo + DMSO      | 0.1988 0.1522         | 0.1755          | 0.0330      | 18.8        | 8.9              |
|    | AA + Wnt3a + DMSO   | 0.6837 0.8460         | 0.7649          | 0.1148      | 15.0        | 100.0            |
| 20 | JNJ26219063         | 0.1911 0.1101         | 0.1506          | 0.0573      | 38.0        | 5.0              |
|    | JNJ26220454         | 0.2772 0.1151         | 0.1962          | 0.1146      | 58.4        | 12.1             |
|    | Sin células         | 0.1278 0.1084         | 0.1181          | 0.0137      | 11.6        | 0.0              |
|    | JNJ26241774         | 0.1443 0.2120         | 0.1782          | 0.0479      | 26.9        | 9.3              |
|    | JNJ26241917         | 0.4413 0.2238         | 0.3326          | 0.1538      | 46.2        | 33.2             |
| 25 | JNJ26243204         | 0.1098 0.1085         | 0.1092          | 0.0009      | 0.8         | -1.4             |
|    | JNJ26247143         | 0.1389 0.2147         | 0.1768          | 0.0536      | 30.3        | 9.1              |
|    | JNJ26248729         | 0.1852 0.1342         | 0.1597          | 0.0361      | 22.6        | 6.4              |
|    | JNJ26261105         | 0.1114 0.1295         | 0.1205          | 0.0128      | 10.6        | 0.4              |
| 30 | JNJ26361712         | 0.5375 0.6158         | 0.5767          | 0.0554      | 9.6         | 70.9             |
|    | JNJ26361725         | 0.1259 0.1441         | 0.1350          | 0.0129      | 9.5         | 2.6              |
|    | JNJ26366730         | 0.1206 0.1312         | 0.1259          | 0.0075      | 6.0         | 1.2              |
|    | JNJ26367991         | 0.2269 0.2857         | 0.2563          | 0.0416      | 16.2        | 21.4             |
| 35 | JNJ26367991         | 0.1140 0.1079         | 0.1110          | 0.0043      | 3.9         | -1.1             |
|    | JNJ26399906         | 0.9589 0.8868         | 0.9229          | 0.0510      | 5.5         | 124.4            |
|    | JNJ26399906         | 1.0442 0.9622         | 1.0032          | 0.0580      | 5.8         | 136.8            |
|    | JNJ26399945         | 0.1961 0.1735         | 0.1848          | 0.0160      | 8.6         | 10.3             |
| 40 | JNJ26399971         | 0.5732 0.5216         | 0.5474          | 0.0365      | 6.7         | 66.4             |
|    | JNJ26399984         | 0.1273 0.1217         | 0.1245          | 0.0040      | 3.2         | 1.0              |
|    | JNJ26399997         | 0.5932 0.6671         | 0.6302          | 0.0523      | 8.3         | 79.2             |
|    | JNJ26400049         | 0.1444 0.1368         | 0.1406          | 0.0054      | 3.8         | 3.5              |
| 45 | JNJ26483197         | 1.0786 1.0891         | 1.0839          | 0.0074      | 0.7         | 149.3            |
|    | JNJ26483310         | 0.5418 0.2338         | 0.3878          | 0.2178      | 56.2        | 41.7             |
|    | JNJ26483223         | 0.1268 0.2052         | 0.1660          | 0.0554      | 33.4        | 7.4              |
|    | JNJ26483236         | 0.1169 0.1184         | 0.1177          | 0.0011      | 0.9         | -0.1             |
| 50 | JNJ26483249         | 0.8618 1.0400         | 0.9509          | 0.1260      | 13.3        | 128.8            |
|    | JNJ26483249         | 0.8430 1.0187         | 0.9309          | 0.1242      | 13.3        | 125.7            |
|    | JNJ26483262         | 0.3659 0.3168         | 0.3414          | 0.0347      | 10.2        | 34.5             |
|    | JNJ26511901         | 0.9184 0.8116         | 0.8650          | 0.0755      | 8.7         | 115.5            |
| 55 | JNJ26511927         | 0.2384 0.3156         | 0.2770          | 0.0546      | 19.7        | 24.6             |
|    | JNJ26511953         | 0.2297 0.1469         | 0.1883          | 0.0585      | 31.1        | 10.9             |
|    | RWJ67694            | 0.1955 0.1256         | 0.1606          | 0.0494      | 30.8        | 6.6              |
|    | RWJ676940           | 0.1658 0.1704         | 0.1681          | 0.0033      | 1.9         | 7.7              |
| 60 | RWJ677545           | 0.1399 0.1303         | 0.1351          | 0.0068      | 5.0         | 2.6              |
|    | RWJ678986           | 0.1234 0.1236         | 0.1235          | 0.0001      | 0.1         | 0.8              |
|    | RWJ680665           | 0.1397 0.2147         | 0.1772          | 0.0530      | 29.9        | 9.1              |
|    | RWJ680667           | 0.1218 0.1310         | 0.1264          | 0.0065      | 5.1         | 1.3              |
| 65 | RWJ680668           | 0.1456 0.1981         | 0.1719          | 0.0371      | 21.6        | 8.3              |



ES 2 656 265 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|                         |                       |                 |             |             |                  |
|-------------------------|-----------------------|-----------------|-------------|-------------|------------------|
| RWJ680669               | 0.5412 0.1898         | 0.3655          | 0.2485      | 68.0        | 38.2             |
| RWJ680858               | 0.1996 0.1245         | 0.1621          | 0.0531      | 32.8        | 6.8              |
| RWJ680858               | 0.1418 0.2014         | 0.1716          | 0.0421      | 24.6        | 8.3              |
| RWJ680879               | 0.1106 0.1197         | 0.1152          | 0.0064      | 5.6         | -0.5             |
| RWJ680885               | 0.1159 0.1272         | 0.1216          | 0.0080      | 6.6         | 0.5              |
| <b>Nombre JNJ</b>       | <b>Datos en bruto</b> | <b>Promedio</b> | <b>S.D.</b> | <b>% CV</b> | <b>% Control</b> |
| Medio acondicionado     | 0.8077 0.7210         | 0.7644          | 0.0613      | 8.0         | 74.7             |
| No tratamiento : + DMSO | 0.4638 0.4073         | 0.4356          | 0.0400      | 9.2         | 36.7             |
| AA/Wnt3a                | 0.8466 0.9935         | 0.9830          | 0.2592      | 26.4        | 100.0            |
| JNJ10222784             | 0.8095 0.9055         | 0.8575          | 0.0679      | 7.9         | 85.5             |
| JNJ10222927             | 0.3519 0.4708         | 0.4114          | 0.0841      | 20.4        | 33.9             |
| JNJ10231273             | 0.1609 0.1275         | 0.1442          | 0.0236      | 16.4        | 3.1              |
| JNJ10259847             | 0.5020 0.2733         | 0.3877          | 0.1617      | 41.7        | 31.2             |
| JNJ10259847             | 0.3413 0.4146         | 0.3780          | 0.0518      | 13.7        | 30.1             |
| JNJ17154215             | 0.1176 0.1174         | 0.1175          | 0.0001      | 0.1         | 0.0              |
| JNJ17154215             | 0.1148 0.1410         | 0.1279          | 0.0185      | 14.5        | 1.2              |
| JNJ17157659             | 0.2394 0.2450         | 0.2422          | 0.0040      | 1.6         | 14.4             |
| JNJ17163042             | 0.3672 0.3098         | 0.3385          | 0.0406      | 12.0        | 25.5             |
| JNJ10166565             | 0.2722 0.1593         | 0.2158          | 0.0798      | 37.0        | 11.3             |
| JNJ17174664             | 0.5079 0.4349         | 0.4714          | 0.0516      | 11.0        | 40.9             |
| JNJ17187027             | 0.1076 0.1168         | 0.1122          | 0.0065      | 5.8         | -0.6             |
| JNJ17187053             | 0.2569 0.2151         | 0.2360          | 0.0296      | 12.5        | 13.7             |
| JNJ17193774             | 0.2846 0.4376         | 0.3611          | 0.1082      | 30.0        | 28.1             |
| JNJ17200976             | 0.1168 0.1136         | 0.1152          | 0.0023      | 2.0         | -0.3             |
| JNJ17205955             | 0.1168 0.1152         | 0.1160          | 0.0011      | 1.0         | -0.2             |
| JNJ17205955             | 0.1137 0.1195         | 0.1166          | 0.0041      | 3.5         | -0.1             |
| JNJ17205994             | 0.1154 0.1152         | 0.1153          | 0.0001      | 0.1         | -0.3             |
| JNJ17226703             | 0.2188 0.2353         | 0.2271          | 0.0117      | 5.1         | 12.6             |
| JNJ17982133             | 0.4588 0.2521         | 0.3555          | 0.1462      | 41.1        | 27.5             |
| JNJ17989049             | 0.3081 0.1961         | 0.2521          | 0.0792      | 31.4        | 15.5             |
| <b>Nombre JNJ</b>       | <b>Datos en bruto</b> | <b>Promedio</b> | <b>S.D.</b> | <b>% CV</b> | <b>% Control</b> |
| Medio acondicionado     | 0.7914 1.1189         | 0.9552          | 0.2316      | 24.2        | 93.3             |
| No tratamiento          | 0.4215 0.5259         | 0.4737          | 0.0738      | 15.6        | 39.8             |
| Sin células             | 0.1152 0.1160         | 0.1156          | 0.0006      | 0.5         | 0.0              |
| AA/Wnt3a                | 0.7168 0.8836         | 1.0151          | 0.2016      | 19.9        | 100.0            |
| RWJ680991               | 0.2882 0.2308         | 0.2844          | 0.0499      | 17.6        | 18.8             |
| RWJ680992               | 0.3049 0.2845         | 0.3127          | 0.0282      | 9.0         | 21.9             |
| RWJ680993               | 0.5403 0.2570         | 0.3855          | 0.1332      | 34.6        | 30.0             |
| RWJ681140               | 0.7323 0.3034         | 0.4388          | 0.2041      | 46.5        | 35.9             |
| RWJ681142               | 0.1185 0.1216         | 0.1199          | 0.0018      | 1.5         | 0.5              |
| RWJ681146               | 0.2496 0.2683         | 0.2302          | 0.0376      | 16.3        | 12.7             |
| RWJ681945               | 0.1548 0.1356         | 0.1513          | 0.0134      | 8.8         | 4.0              |
| RWJ68198                | 0.1555 0.1450         | 0.1581          | 0.0161      | 10.2        | 4.7              |
| RWJ682205               | 0.2347 0.1920         | 0.3785          | 0.2589      | 68.4        | 29.2             |
| RWJ447228               | 0.1842 0.2093         | 0.3793          | 0.2585      | 68.2        | 29.3             |
| RWJ675430               | 0.7223 0.8707         | 0.4291          | 0.2452      | 57.2        | 34.8             |
| RWJ355923               | 0.6268 0.3192         | 0.3354          | 0.1667      | 49.7        | 24.4             |

Tabla VII: efectos de los inhibidores de actividad enzimática GSK-3B en la viabilidad de las células madre embrionarias humanas

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

| Lista de resultados fuertes |                    |
|-----------------------------|--------------------|
| ≥120% control               |                    |
| Número JNJ                  | % valor de control |
| RWJ352628                   | 195.3              |
| JNJ26158093                 | 183.8              |
| RWJ353258                   | 180.4              |
| JNJ26170833                 | 160.9              |
| JNJ26150202                 | 154.6              |
| JNJ25757238                 | 154.1              |
| JNJ19410833                 | 151.6              |
| JNJ26483197                 | 149.3              |
| JNJ18157711                 | 148.0              |
| RWJ676139                   | 147.3              |
| JNJ26077883                 | 146.2              |
| RWJ352190                   | 142.3              |
| JNJ26399906                 | 136.8              |
| JNJ19370026                 | 136.1              |
| JNJ26177762                 | 132.8              |
| RWJ676432                   | 131.6              |
| JNJ25758863                 | 131.2              |
| RWJ675430                   | 130.9              |
| JNJ24843611                 | 130.5              |
| RWJ675605                   | 129.0              |
| JNJ26483249                 | 128.8              |
| JNJ26177086                 | 128.7              |
| JNJ26483249                 | 125.7              |
| JNJ26399906                 | 124.4              |
| RWJ675948                   | 120.0              |

| Lista de resultados moderados |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| 60-120% control               |                    |
| Número JNJ                    | % valor de control |
| JNJ26511901                   | 115.5              |
| RWJ676431                     | 113.8              |
| RWJ673515                     | 108.3              |
| JNJ26533156                   | 105.5              |
| JNJ26153647                   | 102.7              |
| RWJ676639                     | 93.0               |
| JNJ26128726                   | 88.0               |
| JNJ10222784                   | 85.5               |
| RWJ67657                      | 84.7               |
| JNJ26512005                   | 84.0               |
| JNJ19410859                   | 80.3               |
| JNJ26399997                   | 79.2               |
| RWJ676137                     | 77.5               |
| RWJ675260                     | 76.9               |
| RWJ355923                     | 76.7               |
| RWJ675266                     | 75.2               |
| JNJ26116922                   | 71.4               |
| JNJ26361712                   | 70.9               |
| RWJ670804                     | 70.7               |
| RWJ675881                     | 69.9               |
| JNJ26158015                   | 68.7               |
| RWJ352244                     | 68.2               |
| RWJ674239                     | 67.4               |
| JNJ26399971                   | 66.4               |
| JNJ26714194                   | 63.3               |
| JNJ26533065                   | 61.1               |

ES 2 656 265 T3

Tabla VIII: Efectos DEPENDIENTES de dosis de inhibidores de la actividad enzimática GSK-3B sobre la proliferación de CÉLULAS DE LA célula madre embrionaria humana LÍNEA H1.

| Concentración | JNJ10220067   |       | JNJ17163796   |       | JNJ17189731   |       | JNJ17223375   |       | JNJ18157698   |       |
|---------------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|
| [ $\mu$ M]    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    |
| 10            | 1.006         | 0.051 | 0.039         | 0.049 | 0.193         | 0.147 | 1.280         | 0.014 | 1.049         | 0.062 |
| 5             | 1.058         | 0.047 | 1.164         | 0.018 | 0.889         | 0.035 | 1.348         | 0.007 | 1.104         | 0.014 |
| 2.5           | 1.031         | 0.054 | 1.022         | 0.023 | 0.896         | 0.035 | 1.318         | 0.028 | 0.932         | 0.087 |
| 1.25          | 0.899         | 0.040 | 1.121         | 0.023 | 1.120         | 0.072 | 1.159         | 0.041 | 1.006         | 0.023 |
| 0.625         | 0.742         | 0.095 | 1.092         | 0.044 | 1.107         | 0.093 | 1.029         | 0.018 | 0.832         | 0.026 |
| 0.313         | 0.754         | 0.010 | 0.931         | 0.056 | 1.132         | 0.018 | 1.018         | 0.044 | 0.742         | 0.127 |
| 0.156         | 0.822         | 0.074 | 0.804         | 0.002 | 1.082         | 0.041 | 0.776         | 0.054 | 0.712         | 0.020 |
| Concentración | JNJ26158015   |       | JNJ26483197   |       | JNJ26483249   |       | JNJ17225871   |       | JNJ17228458   |       |
| [ $\mu$ M]    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    |
| 10            | 0.001         | 0.001 | 0.096         | 0.103 | 0.058         | 0.074 | 0.290         | 0.307 | 0.000         | 0.000 |
| 5             | 0.034         | 0.035 | 0.262         | 0.268 | 0.173         | 0.207 | 0.458         | 0.263 | 0.089         | 0.067 |
| 2.5           | 0.566         | 0.461 | 0.592         | 0.019 | 0.428         | 0.326 | 0.640         | 0.104 | 0.438         | 0.050 |
| 1.25          | 0.897         | 0.103 | 1.124         | 0.101 | 0.850         | 0.238 | 0.739         | 0.129 | 0.636         | 0.016 |
| 0.625         | 0.921         | 0.122 | 1.106         | 0.056 | 0.910         | 0.061 | 0.805         | 0.036 | 0.736         | 0.025 |
| 0.313         | 1.028         | 0.069 | 0.888         | 0.213 | 0.868         | 0.131 | 0.785         | 0.094 | 0.791         | 0.038 |
| 0.156         | 1.027         | 0.067 | 0.890         | 0.079 | 0.742         | 0.051 | 0.774         | 0.027 | 0.832         | 0.005 |
| Concentración | JNJ19370026   |       | JNJ26150202   |       | JNJ26170833   |       | JNJ26177086   |       | JNJ2617762    |       |
| [ $\mu$ M]    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    |
| 10            | 0.000         | 0.000 | 0.496         | 0.690 | 0.129         | 0.170 | 0.412         | 0.081 | 0.996         | 0.246 |
| 5             | 0.024         | 0.034 | 0.768         | 0.490 | 0.530         | 0.080 | 1.128         | 0.026 | 0.908         | 0.179 |
| 2.5           | 1.097         | 0.294 | 1.001         | 0.129 | 1.174         | 0.016 | 1.031         | 0.217 | 1.005         | 0.086 |
| 1.25          | 1.446         | 0.076 | 1.158         | 0.043 | 1.113         | 0.057 | 0.914         | 0.100 | 1.200         | 0.085 |
| 0.625         | 1.296         | 0.183 | 0.699         | 0.248 | 1.188         | 0.041 | 0.801         | 0.136 | 1.111         | 0.300 |
| 0.313         | 1.034         | 0.197 | 0.617         | 0.232 | 1.158         | 0.102 | 0.785         | 0.121 | 0.959         | 0.094 |
| 0.156         | 0.826         | 0.030 | 0.812         | 0.120 | 0.974         | 0.065 | 0.659         | 0.068 | 0.912         | 0.059 |
| Concentración | JNJ26512005   |       | JNJ26533065   |       | JNJ26533156   |       | JNJ26714194   |       | JNJ3026582    |       |
| [ $\mu$ M]    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    |
| 10            | 0.000         | 0.000 | 0.021         | 0.027 | 0.002         | 0.002 | 0.052         | 0.067 | 0.053         | 0.024 |
| 5             | 0.000         | 0.000 | 0.339         | 0.254 | 1.011         | 0.499 | 1.161         | 0.134 | 0.905         | 0.036 |
| 2.5           | 0.192         | 0.233 | 1.350         | 0.170 | 1.724         | 0.042 | 1.293         | 0.020 | 1.019         | 0.015 |
| 1.25          | 0.552         | 0.458 | 1.277         | 0.101 | 1.652         | 0.032 | 1.213         | 0.087 | 1.163         | 0.062 |
| 0.625         | 0.895         | 0.054 | 0.713         | 0.151 | 1.357         | 0.023 | 1.025         | 0.045 | 1.231         | 0.152 |
| 0.313         | 0.734         | 0.075 | 0.665         | 0.207 | 1.213         | 0.177 | 1.241         | 0.031 | 1.216         | 0.007 |
| 0.156         | 0.594         | 0.078 | 0.469         | 0.465 | 1.206         | 0.142 | 1.041         | 0.007 | 1.103         | 0.065 |

Tabla IX: Efectos DEPENDIENTES de dosis de los inhibidores de la actividad enzimática GSK-3B en la DIFERENCIACIÓN de las CÉLULAS DE LAS células madre embrionarias humanas LÍNEA H1

| Concentración | JNJ10220067      |       | JNJ17163796      |       | JNJ17189731      |       | JNJ17223375      |       | JNJ18157698      |       |
|---------------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
| [ $\mu$ M]    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    |
| 10            | 0.889            | 0.144 | 0.029            | 0.034 | 0.140            | 0.095 | 1.183            | 0.044 | 0.969            | 0.040 |
| 5             | 1.004            | 0.021 | 0.824            | 0.035 | 0.785            | 0.077 | 1.171            | 0.010 | 1.013            | 0.002 |
| 2.5           | 1.023            | 0.092 | 0.849            | 0.003 | 0.842            | 0.032 | 1.169            | 0.031 | 0.838            | 0.068 |
| 1.25          | 0.954            | 0.100 | 0.985            | 0.082 | 1.028            | 0.043 | 1.106            | 0.006 | 0.940            | 0.071 |
| 0.625         | 0.793            | 0.135 | 0.986            | 0.059 | 1.016            | 0.000 | 0.931            | 0.033 | 0.767            | 0.014 |
| 0.313         | 0.803            | 0.048 | 0.916            | 0.028 | 1.058            | 0.017 | 0.943            | 0.056 | 0.692            | 0.167 |
| 0.156         | 0.941            | 0.106 | 0.822            | 0.036 | 1.039            | 0.015 | 0.789            | 0.074 | 0.651            | 0.032 |
| Concentración | JNJ26158015      |       | JNJ26483197      |       | JNJ26483249      |       | JNJ17225871      |       | JNJ17228458      |       |
| [ $\mu$ M]    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    |
| 10            | 0.001            | 0.001 | 0.034            | 0.027 | 0.054            | 0.063 | 0.267            | 0.280 | 0.000            | 0.001 |
| 5             | 0.017            | 0.020 | 0.071            | 0.054 | 0.141            | 0.169 | 0.402            | 0.229 | 0.056            | 0.035 |
| 2.5           | 0.200            | 0.157 | 0.497            | 0.076 | 0.373            | 0.326 | 0.605            | 0.041 | 0.286            | 0.034 |
| 1.25          | 0.792            | 0.066 | 0.993            | 0.144 | 0.783            | 0.282 | 0.686            | 0.185 | 0.587            | 0.023 |
| 0.625         | 0.824            | 0.118 | 1.061            | 0.066 | 0.887            | 0.062 | 0.786            | 0.061 | 0.695            | 0.001 |
| 0.313         | 0.934            | 0.127 | 0.937            | 0.136 | 0.859            | 0.176 | 0.780            | 0.132 | 0.753            | 0.098 |
| 0.156         | 0.986            | 0.055 | 0.888            | 0.062 | 0.666            | 0.015 | 0.782            | 0.061 | 0.816            | 0.043 |
| Concentración | JNJ19370026      |       | JNJ26150202      |       | JNJ26170833      |       | JNJ26177086      |       | JNJ26177762      |       |
| [ $\mu$ M]    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    |
| 10            | 0.000            | 0.000 | 0.491            | 0.681 | 0.281            | 0.358 | 0.330            | 0.059 | 0.701            | 0.307 |
| 5             | 0.035            | 0.049 | 0.158            | 0.224 | 0.460            | 0.189 | 0.846            | 0.036 | 0.728            | 0.146 |
| 2.5           | 1.336            | 0.192 | 0.800            | 0.201 | 1.018            | 0.139 | 0.887            | 0.191 | 0.928            | 0.019 |
| 1.25          | 1.238            | 0.030 | 0.910            | 0.045 | 0.960            | 0.106 | 0.819            | 0.179 | 1.159            | 0.093 |
| 0.625         | 0.997            | 0.095 | 0.567            | 0.190 | 1.050            | 0.038 | 0.755            | 0.126 | 1.136            | 0.186 |
| 0.313         | 0.791            | 0.172 | 0.515            | 0.276 | 1.032            | 0.063 | 0.667            | 0.125 | 1.006            | 0.009 |
| 0.156         | 0.669            | 0.037 | 0.708            | 0.148 | 0.950            | 0.087 | 0.628            | 0.053 | 0.922            | 0.096 |
| Concentración | JNJ26512005      |       | JNJ26533065      |       | JNJ26533156      |       | JNJ26714194      |       | JNJ3026582       |       |
| [ $\mu$ M]    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    |
| 10            | 0.000            | 0.000 | 0.018            | 0.021 | 0.002            | 0.001 | 0.054            | 0.062 | 0.074            | 0.048 |
| 5             | 0.000            | 0.000 | 0.235            | 0.174 | 1.052            | 0.281 | 1.250            | 0.177 | 1.006            | 0.070 |
| 2.5           | 0.270            | 0.382 | 1.153            | 0.223 | 1.459            | 0.074 | 1.186            | 0.069 | 1.120            | 0.038 |
| 1.25          | 0.678            | 0.434 | 1.055            | 0.046 | 1.322            | 0.078 | 1.112            | 0.038 | 1.122            | 0.009 |
| 0.625         | 0.978            | 0.021 | 0.569            | 0.124 | 1.173            | 0.015 | 0.913            | 0.005 | 1.241            | 0.230 |
| 0.313         | 0.742            | 0.048 | 0.555            | 0.118 | 1.102            | 0.165 | 1.140            | 0.036 | 1.231            | 0.012 |
| 0.156         | 0.508            | 0.049 | 0.451            | 0.443 | 1.060            | 0.126 | 0.998            | 0.006 | 1.034            | 0.008 |

ES 2 656 265 T3

Tabla X: Efectos DEPENDIENTES de dosis de los inhibidores de la actividad enzimática GSK-3B en la DIFERENCIACIÓN de las CÉLULAS DE LAS células madre embrionarias humanas LÍNEA H9.

| Concentración [uM] | JNJ10220067   |       | JNJ17163796   |       | JNJ17189731   |       | JNJ17223375   |       | JNJ18157698   |       |
|--------------------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|
| [uM]               | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    |
| 10                 | 0.164         | 0.209 | 0.001         | 0.000 | 0.049         | 0.028 | 0.123         | 0.106 | 0.770         | 0.077 |
| 5                  | 0.147         | 0.141 | 0.616         | 0.497 | 0.583         | 0.155 | 0.954         | 0.146 | 0.496         | 0.011 |
| 2.5                | 0.140         | 0.112 | 1.295         | 0.402 | 1.108         | 0.170 | 0.795         | 0.101 | 0.384         | 0.247 |
| 1.25               | 0.307         | 0.198 | 1.233         | 0.058 | 1.195         | 0.147 | 0.541         | 0.051 | 0.395         | 0.002 |
| 0.625              | 0.138         | 0.071 | 0.606         | 0.121 | 1.100         | 0.014 | 0.332         | 0.049 | 0.221         | 0.009 |
| 0.313              | 0.063         | 0.008 | 0.397         | 0.020 | 0.887         | 0.078 | 0.206         | 0.085 | 0.172         | 0.071 |
| 0.156              | 0.069         | 0.001 | 0.214         | 0.025 | 0.699         | 0.109 | 0.142         | 0.039 | 0.138         | 0.048 |
| Concentración [uM] | JNJ26158015   |       | JNJ26483197   |       | JNJ26483249   |       | JNJ17225871   |       | JNJ17228458   |       |
| [uM]               | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    |
| 10                 | 0.001         | 0.000 | 0.785         | 0.192 | 0.208         | 0.134 | 0.377         | 0.040 | 0.000         | 0.000 |
| 5                  | 0.023         | 0.024 | 1.067         | 0.236 | 0.320         | 0.087 | 0.336         | 0.081 | 0.052         | 0.009 |
| 2.5                | 0.681         | 0.223 | 1.368         | 0.025 | 0.388         | 0.019 | 0.296         | 0.016 | 0.089         | 0.003 |
| 1.25               | 1.011         | 0.461 | 1.477         | 0.147 | 0.334         | 0.113 | 0.222         | 0.035 | 0.106         | 0.003 |
| 0.625              | 0.927         | 0.108 | 0.899         | 0.108 | 0.267         | 0.148 | 0.282         | 0.096 | 0.169         | 0.041 |
| 0.313              | 0.686         | 0.022 | 0.540         | 0.094 | 0.192         | 0.056 | 0.208         | 0.003 | 0.119         | 0.026 |
| 0.156              | 0.458         | 0.001 | 0.206         | 0.089 | 0.147         | 0.067 | 0.174         | 0.051 | 0.067         | 0.015 |
| Concentración [uM] | JNJ19370026   |       | JNJ26150202   |       | JNJ26170833   |       | JNJ26177086   |       | JNJ26177762   |       |
| [uM]               | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    |
| 10                 | 0.000         | 0.000 | 0.452         | 0.094 | 0.002         | 0.001 | 1.117         | 0.043 | 1.022         | 0.422 |
| 5                  | 0.002         | 0.000 | 0.433         | 0.050 | 1.325         | 0.015 | 0.793         | 0.030 | 1.281         | 0.109 |
| 2.5                | 0.668         | 0.059 | 0.521         | 0.229 | 1.355         | 0.026 | 0.600         | 0.122 | 1.197         | 0.068 |
| 1.25               | 0.988         | 0.032 | 0.293         | 0.038 | 1.182         | 0.076 | 0.442         | 0.018 | 1.039         | 0.213 |
| 0.625              | 0.390         | 0.032 | 0.200         | 0.122 | 0.928         | 0.127 | 0.371         | 0.072 | 0.686         | 0.014 |
| 0.313              | 0.250         | 0.090 | 0.072         | 0.025 | 0.772         | 0.050 | 0.100         | 0.008 | 0.437         | 0.066 |
| 0.156              | 0.095         | 0.020 | 0.057         | 0.044 | 0.336         | 0.056 | 0.072         | 0.015 | 0.276         | 0.043 |
| Concentración [uM] | JNJ26512005   |       | JNJ26533065   |       | JNJ26533156   |       | JNJ26714194   |       | JNJ3026582    |       |
| [uM]               | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    | Nº de células | SD    |
| 10                 | 0.007         | 0.002 | 0.000         | 0.000 | 0.000         | 0.000 | 0.044         | 0.038 | 0.004         | 0.001 |
| 5                  | 0.002         | 0.001 | 0.127         | 0.069 | 0.415         | 0.023 | 0.382         | 0.110 | 0.017         | 0.003 |
| 2.5                | 0.001         | 0.001 | 0.151         | 0.059 | 0.425         | 0.082 | 0.345         | 0.001 | 0.033         | 0.037 |
| 1.25               | 0.090         | 0.097 | 0.108         | 0.051 | 0.325         | 0.042 | 0.284         | 0.076 | 0.044         | 0.028 |
| 0.625              | 0.248         | 0.058 | 0.230         | 0.168 | 0.314         | 0.062 | 0.266         | 0.021 | 0.100         | 0.099 |
| 0.313              | 0.264         | 0.048 | 0.086         | 0.033 | 0.267         | 0.098 | 0.347         | 0.084 | 0.057         | 0.032 |
| 0.156              | 0.133         | 0.069 | 0.063         | 0.004 | 0.218         | 0.012 | 0.192         | 0.014 | 0.070         | 0.048 |

ES 2 656 265 T3

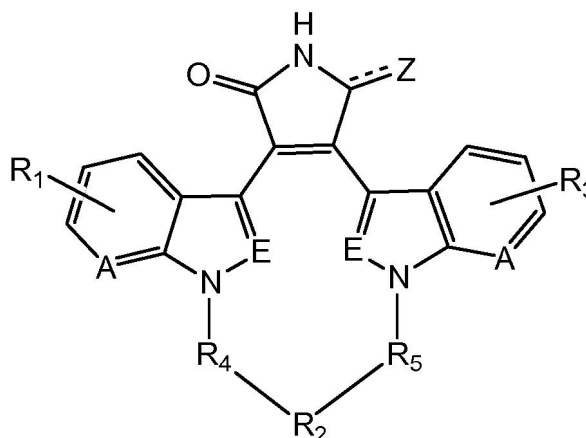
Tabla XI: Efectos DEPENDIENTES de la dosis de los inhibidores de la actividad enzimática GSK-3B en la DIFERENCIACIÓN de las CÉLULAS de la línea de células madre embrionarias humanas H9.

| Concentración <sub>i</sub> | JNJ10220067      |       | JNJ17163796      |       | JNJ17189731      |       | JNJ17223375      |       | JNJ18157698      |       |
|----------------------------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
| [ $\mu$ M]                 | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    |
| 0.157                      | 0.051            | 0.003 | 0.132            | 0.003 | 0.678            | 0.093 | 0.116            | 0.047 | 0.095            | 0.025 |
| 0.313                      | 0.052            | 0.008 | 0.311            | 0.005 | 0.951            | 0.010 | 0.155            | 0.071 | 0.110            | 0.030 |
| 0.625                      | 0.103            | 0.058 | 0.453            | 0.076 | 1.160            | 0.013 | 0.277            | 0.061 | 0.154            | 0.013 |
| 1.25                       | 0.312            | 0.255 | 1.012            | 0.051 | 1.042            | 0.134 | 0.459            | 0.066 | 0.317            | 0.062 |
| 2.5                        | 0.100            | 0.062 | 0.986            | 0.269 | 0.869            | 0.158 | 0.726            | 0.079 | 0.297            | 0.235 |
| 5                          | 0.105            | 0.089 | 0.480            | 0.423 | 0.432            | 0.111 | 1.114            | 0.066 | 0.353            | 0.080 |
| 10                         | 0.121            | 0.141 | 0.002            | 0.002 | 0.022            | 0.005 | 0.140            | 0.110 | 0.694            | 0.123 |
| Concentración <sub>i</sub> | JNJ26158015      |       | JNJ26483197      |       | JNJ26483249      |       | JNJ17225871      |       | JNJ17228458      |       |
| [ $\mu$ M]                 | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    |
| 0.157                      | 0.364            | 0.044 | 0.149            | 0.058 | 0.125            | 0.051 | 0.132            | 0.063 | 0.039            | 0.010 |
| 0.313                      | 0.577            | 0.062 | 0.398            | 0.166 | 0.129            | 0.018 | 0.146            | 0.005 | 0.070            | 0.027 |
| 0.625                      | 0.985            | 0.072 | 0.678            | 0.197 | 0.212            | 0.134 | 0.196            | 0.084 | 0.137            | 0.049 |
| 1.25                       | 0.943            | 0.419 | 1.110            | 0.042 | 0.202            | 0.103 | 0.129            | 0.029 | 0.075            | 0.017 |
| 2.5                        | 0.559            | 0.238 | 0.857            | 0.012 | 0.209            | 0.045 | 0.177            | 0.030 | 0.053            | 0.005 |
| 5                          | 0.019            | 0.019 | 0.194            | 0.007 | 0.154            | 0.023 | 0.174            | 0.070 | 0.038            | 0.001 |
| 10                         | 0.001            | 0.001 | 0.129            | 0.037 | 0.129            | 0.067 | 0.200            | 0.022 | 0.000            | 0.000 |
| Concentración <sub>i</sub> | JNJ19370026      |       | JNJ26150202      |       | JNJ26170833      |       | JNJ26177086      |       | JNJ26177762      |       |
| [ $\mu$ M]                 | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    |
| 0.157                      | 0.074            | 0.024 | 0.040            | 0.030 | 0.291            | 0.086 | 0.054            | 0.014 | 0.186            | 0.040 |
| 0.313                      | 0.170            | 0.046 | 0.051            | 0.016 | 0.746            | 0.088 | 0.080            | 0.006 | 0.342            | 0.068 |
| 0.625                      | 0.246            | 0.036 | 0.150            | 0.095 | 0.941            | 0.111 | 0.268            | 0.050 | 0.563            | 0.019 |
| 1.25                       | 0.981            | 0.075 | 0.155            | 0.010 | 1.119            | 0.045 | 0.332            | 0.006 | 0.936            | 0.186 |
| 2.5                        | 0.914            | 0.038 | 0.408            | 0.279 | 1.305            | 0.066 | 0.432            | 0.154 | 1.146            | 0.137 |
| 5                          | 0.001            | 0.001 | 0.251            | 0.092 | 1.185            | 0.012 | 0.543            | 0.004 | 1.127            | 0.121 |
| 10                         | 0.000            | 0.000 | 0.262            | 0.068 | 0.000            | 0.000 | 0.822            | 0.024 | 0.759            | 0.328 |
| Concentración <sub>i</sub> | JNJ26512005      |       | JNJ26533065      |       | JNJ26533156      |       | JNJ26174194      |       | JNJ3026582       |       |
| [ $\mu$ M]                 | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    | Intensidad Sox17 | SD    |
| 0.157                      | 0.085            | 0.041 | 0.049            | 0.011 | 0.173            | 0.009 | 0.146            | 0.041 | 0.059            | 0.051 |
| 0.313                      | 0.240            | 0.030 | 0.068            | 0.010 | 0.203            | 0.061 | 0.282            | 0.135 | 0.054            | 0.040 |
| 0.625                      | 0.165            | 0.043 | 0.222            | 0.201 | 0.220            | 0.070 | 0.202            | 0.013 | 0.073            | 0.066 |
| 1.25                       | 0.114            | 0.134 | 0.076            | 0.034 | 0.202            | 0.002 | 0.165            | 0.030 | 0.053            | 0.035 |
| 2.5                        | 0.001            | 0.001 | 0.120            | 0.066 | 0.299            | 0.019 | 0.205            | 0.002 | 0.042            | 0.049 |
| 5                          | 0.001            | 0.001 | 0.087            | 0.036 | 0.300            | 0.095 | 0.234            | 0.078 | 0.016            | 0.001 |
| 10                         | 0.009            | 0.003 | 0.000            | 0.000 | 0.000            | 0.000 | 0.042            | 0.028 | 0.004            | 0.003 |

**Reivindicaciones**

1. Un método para expandir y diferenciar células pluripotentes, que comprende las etapas de:

- 5 a) Cultivar células pluripotentes, y  
 b) Tratar las células pluripotentes con un inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B, en donde el inhibidor es un compuesto de la Fórmula (III):



Formula (III).

2. El método de la reivindicación 1, en donde las células pluripotentes son:

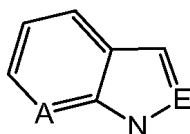
- 30 a) Células madre embrionarias; o  
 b) Células que expresan marcadores de pluripotencia, derivadas de células madre embrionarias, en donde preferiblemente, las células que expresan marcadores de pluripotencia expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores de pluripotencia seleccionados del grupo que consiste de: ABCG2, cripto, FoxD3, Conexina43, Conexina45, Oct4, SOX-2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tral-60 y Tral-81;  
 35 o  
 c) Diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo; o  
 d) Tratadas con el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B durante una a 72 horas; o  
 e) Tratadas con el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B durante 12 a 48 horas; o  
 40 f) Tratadas con el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B durante 48 horas.

3. El método de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la actividad de la enzima de GSK-3B se:

- 45 a) Usa a una concentración de 100 nM a 100 µM; o  
 b) Usa a una concentración de 1 µM a 10 µM; o

se usa a una concentración de 10 µM.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se usa un compuesto de la Fórmula (III), en donde A y E se seleccionan independientemente del grupo que consiste de un átomo de carbono sustituido con hidrógeno y un átomo de hidrógeno; en donde



se selecciona independientemente del grupo que consiste de 1H-indol, 1H-pirrolo[2,3-b]piridina, 1H-pirazolo[3,4-b]-piridina y 1H-indazol;

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde Z se selecciona de O, alternativamente, Z se selecciona de dihidro; en donde cada átomo de de hidrógeno está unido por un enlace sencillo.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente de alquilo C<sub>1-8</sub>, alqueno C<sub>2-8</sub> y alquino C<sub>2-8</sub> opcionalmente sustituido con oxo.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste de -alquilo C<sub>1-8</sub>, -alqueno C<sub>1-8</sub>, -alquino C<sub>1-8</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo-O-, -O-(C<sub>2-8</sub>)alqueno-O-, -O-(C<sub>2-8</sub>)alquino-O-, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquil-C(O)- (en donde cualquiera de los grupos de ligamiento alquilo, alqueno y alquino precedentes son cadenas de carbono lineales opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -alquilo C<sub>1-8</sub>-C(O)O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxilo, hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo y oxo; y, en donde cualquiera de los grupos de ligamiento alquilo, alqueno y alquino precedentes está opcionalmente sustituidos con de uno a dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de heterociclilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, arilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heteroarilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, espirocicloalquilo y espiroheterociclilo (en donde cualquiera de los sustituyentes de cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde cualquiera de los sustituyentes de heterociclilo precedentes está opcionalmente sustituido con oxo), cicloalquilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo (en donde el cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con oxo), -(O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>)<sub>0-5</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -(O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>)<sub>0-5</sub>-NR<sub>6</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-, -(O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>)<sub>0-5</sub>-S-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -NR<sub>6</sub>-, -NR<sub>6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>8</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(O)-, -C(O)-NR<sub>6</sub>-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-C(O)-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(O)-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(NR<sub>7</sub>)-NR<sub>8</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>- y -SO<sub>2</sub>- (en donde R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heterociclil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, arilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo y heteroarilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde los sustituyentes de heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con oxo)); con la condición de que, si A y E se seleccionan de un átomo de carbono sustituido con hidrógeno, entonces R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste de -alquino C<sub>2-8</sub>, -O-(C<sub>1-8</sub>)alquil-O-, -O-(C<sub>2-8</sub>)alqueno-O-, -O-(C<sub>2-8</sub>)alquino-O-, -C(O)-(C<sub>1-8</sub>)alquil-C(O)- (en donde cualquiera de los grupos de ligamiento alquilo, alqueno y alquino precedentes son cadenas de carbono lineales sustituidas opcionalmente con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -C(O)O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, -alquilo C<sub>1-8</sub>-C(O)O-(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxilo, hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo y oxo; y, en donde cualquiera de los grupos de ligamiento alquilo, alqueno y alquino precedentes está opcionalmente sustituidos con de uno a dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de heterociclilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, arilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heteroarilo(C<sub>1-8</sub>)alquilo, espirocicloalquilo y espiroheterociclilo(en donde cualquiera de los sustituyentes de cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde cualquiera de los sustituyentes de heterociclilo precedentes está opcionalmente sustituido con oxo), cicloalquilo (en donde el cicloalquilo está opcionalmente sustituido con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>)<sub>1-5</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -O-



5 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-, -  
 10 (O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>)<sub>0-5</sub>-S-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -NR<sub>6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-  
 15 (CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>8</sub>-, -NR<sub>9</sub>-C(O)-, -C(O)-NR<sub>9</sub>-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-C(O)-, -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-  
 20 (CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(O)-NR<sub>7</sub>-, -NR<sub>6</sub>-C(NR<sub>7</sub>)-NR<sub>8</sub>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-O-, -S-  
 25 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S- y -NR<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NR<sub>7</sub>- (en donde R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heterocicli(C<sub>1-8</sub>)alquilo, aril(C<sub>1-8</sub>)alquilo y heteroaril(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde los sustituyentes de heterocicilo, arilo y heteroarilo precedentes están opcionalmente sustituidos con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo consistente de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde el heterocicli(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde R<sub>9</sub> se selecciona del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, heterocicli(C<sub>1-8</sub>)alquilo, aril(C<sub>1-8</sub>)alquilo y heteroaril(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde los sustituyentes de heterocicilo, arilo y heteroarilo precedentes están sustituidos opcionalmente con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo; y, en donde el heterocicli(C<sub>1-8</sub>)alquilo está opcionalmente sustituido con oxo)).

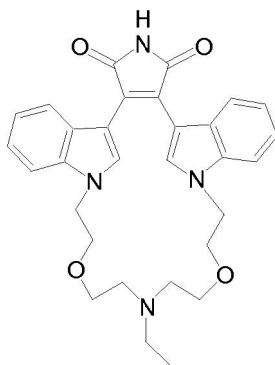
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C<sub>1-8</sub>, alqueno C<sub>2-8</sub>, alquino C<sub>2-8</sub> (en donde el alquilo, alqueno y alquino están opcionalmente sustituidos con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), (halo)<sub>1-3</sub>, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi, hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo y oxo), alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxycarbonilo C<sub>1-8</sub>, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, alquilo C<sub>1-8</sub>, arilo, heteroarilo (en donde el arilo y el heteroarilo están opcionalmente sustituidos con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alcoxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, carboxilo, carboxil(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), amino(C<sub>1-8</sub>)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), halógeno, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alquilo, (halo)<sub>1-3</sub>(C<sub>1-8</sub>)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C<sub>1-8</sub>)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>), ciano, halógeno, hidroxi y nitro; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

9. El método de la reivindicación 1; en donde el compuesto de Fórmula (III) es:

- a) 6,7,9,10,12,13,15,16-octahidro-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H-dipirido[2,3-k:3',2'-q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]trioxadiazacicloheptacosina-23,25(24H)-diona; o
- b) 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23-decahidro-9,4:24,29-dimeteno-1H-dipirido[2,3-n:3',2'-t]pirrolo[3,4-q][1,4,7,10,13,22]tetraoxadiazacicotetracosina-1,3(2H)-diona; o
- c) 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23,25,26-dodecahidro-9,4:27,32-dimeteno-1H-dipirido[2,3-q:3',2'-w]pirrolo[3,4-t][1,4,7,10,13,16,25]pentaoxadiazacicloheptacosina-1,3(2H)-diona; o
- d) 6,7,9,10,12,13-hexahidro-20H-5,23:14,19-dimeteno-5H-dibenzo[h,n]pirrolo[3,4-k][1,4,7,16]dioxadiazaciclooctadecina-20,22(21H)-diona; o
- e) 6,7,9,10,12,13,15,16-octahidro-23H-5,26:17,22-dimeteno-5H-dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]trioxadiazacicloheptacosina-23,25(24H)-diona; o
- f) 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23-decahidro-9,4:24,29-dimeteno-1H-dibenzo[n,t]pirrolo[3,4-q][1,4,7,10,13,22]tetraoxadiazacicotetracosina-1,3(2H)-diona; o
- g) 3-[1-[3-[(2-hidroxi-etil)metilamino]propil]-1H-indazol-3-il]-4-[1-(3-piridinil)-1H-indol-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona; o
- h) 3,5-dicloro-N-[3-cloro-4-[(3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]tiazino[3,4-c][1,4]benzodiazepin-11(6H)-il)carbonil]fenil]-benzamida; o
- i) 3-(2-metoxi-fenil)-4-(1-piridin-3-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona; o
- j) 6-[[2-[[4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)-2-pirimidinil]amino]etil]amino]-3-piridincarbonitrilo; o
- k) 3-(5-cloro-1-metil-1H-indol-3-il)-4-[1-(3-imidazol-1-il-propil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona; o
- l) 3-(5-cloro-1-metil-1H-indol-3-il)-4-[1-(3-[1,2,3]triazol-1-il-propil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona; o
- m) 3-[1-(3-hidroxi-propil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-3-il)-pirrol-2,5-diona; o
- n) 3-[1-(3-hidroxi-3-metil-butil)-1H-indazol-3-il]-4-(1-piridin-3-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona; o
- o) 3-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indazol-3-il]-4-(1-pirimidin-5-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona; o

- p) 3-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indol-3-il]-4-(1-pirimidin-5-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona; o  
 q) Compuesto 1a

5

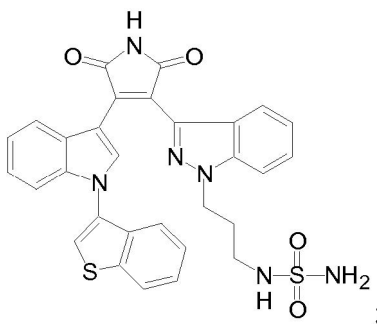


10

15

- o  
 r) Compuesto 10a

20



25

30

- o  
 s) (11Z)-8,9,10,13,14,15-hexahidro-2,6:17,21-di(meteno)pirrolo[3,4-h][1,15,7]dioxazaciclotricosina-22,24(1H,23H)-diona; o  
 35 t) 3-(5-cloro-1-piridin-3-il)-1H-indol-3-il]-4-[1-(3-hidroxi-propil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona; o  
 u) 3-(2-metoxi-fenil)-4-[1-(3-metoxi-propil)-1H-pirrol[3,2-c]piridin-3-il]-pirrol-2,5-diona; o  
 v) 3-[1-(3-hidroxi-propil)-1H-indazol-3-il]-4-[1-(tetrahidro-piran-4-il)-1H-indol-3-il]-pirrol-2,5-diona; o  
 w) 2-{3-[4-(5-cloro-1-metil-1H-indol-3-il)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]-indazol-1-il}-N-(2-hidroxi-etil)-acetamida; o  
 40 x) 4-(3-cloro-fenil)-6-(3-dimetil-amino-propil)-5,6-dihidro-4H-2,4,6-triaza-ciclopenta[c]fluorine-1,3-diona; o  
 y) 14-etil-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-dimeteno-dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona; o  
 z) 14-benzil-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona; o  
 45 aa) 3-(1-{2-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-etil}-1H-indol-3-il)-4-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indol-3-il]-pirrol-2,5-diona; o  
 bb) 6,7,8,9,10,11,12,13-octahidro-8,11-dimetil-5,23:14,19-dimeteno-20H-dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10]tetraazaciclooctadecina-20,22(21H)-diona; o  
 cc) 7,8,9,10,12,13,16,17,18,19-decahidro-8,17-dimetil-15H,26H-5,29:20,25-dimeteno-6H-dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19,22]dioxatetraazaciclotetracosina-26,28(27H)-diona; o  
 50 dd) 14-(2-furilmetil)-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona; o  
 ee) 14-(2-tienilmetil)-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona; o  
 ff) 14-(1-naftilmetil)-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona; o  
 55 gg) 14-(piridin-4-ilmetil)-6,7,9,10,13,14,15,16-octahidro-12H,23H-5,26:17,22-di(meteno)dibenzo[k,q]pirrolo[3,4-n][1,4,7,10,19]dioxatriazacicloheicosina-23,25(24H)-diona; o  
 hh) 3-[1-(2-{2-[2-(1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-il-amino)-etoxi]-etoxi]-etil}-1H-indol-3-il)-4-{1-[2-(1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-il-amino)-etil]-1H-indol-3-il]-pirrol-2,5-diona; o  
 60 ii) 3-[1-(3-dimetil-amino-fenil)-1H-indol-3-il]-4-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona; o  
 jj) 3-[5-cloro-1-(6-dimetil-amino-piridin-3-il)-1H-indol-3-il]-4-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indazol-3-il]-pirrol-2,5-diona; o  
 kk) éster metílico de ácido 5-(5-cloro-3-{4-[1-(2-hidroxi-etil)-1H-indazol-3-il]-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il}-indol-1-il)-nicotínico

65

Figura 1A

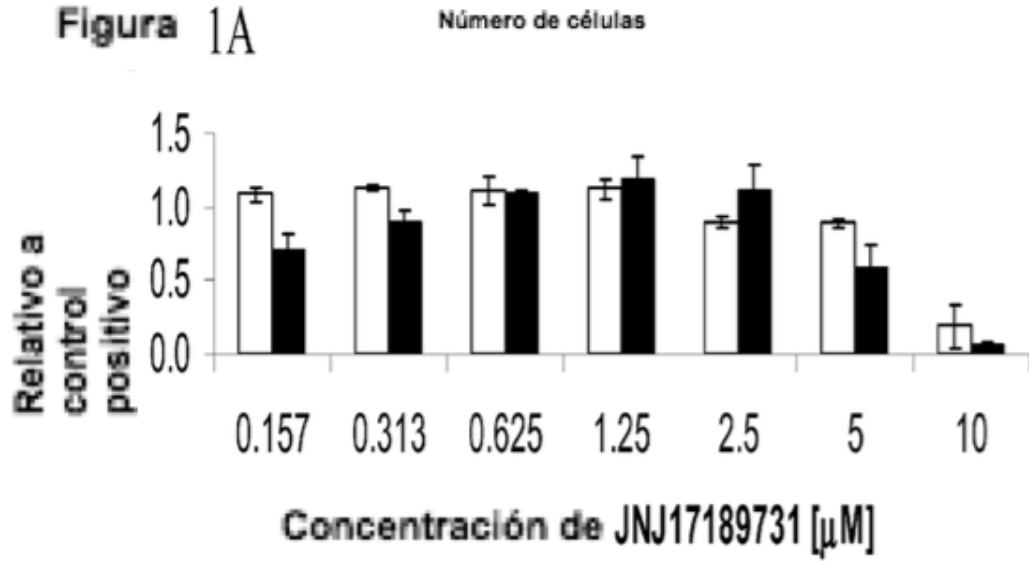
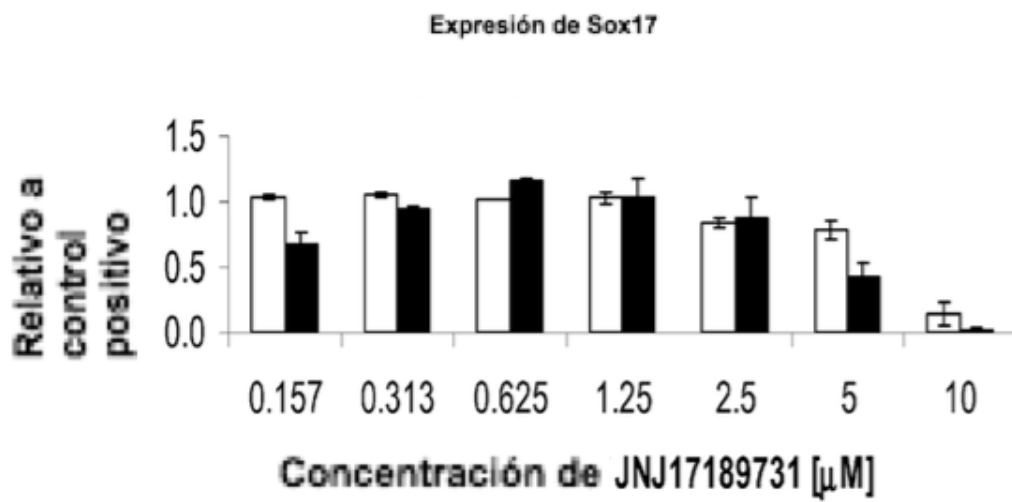
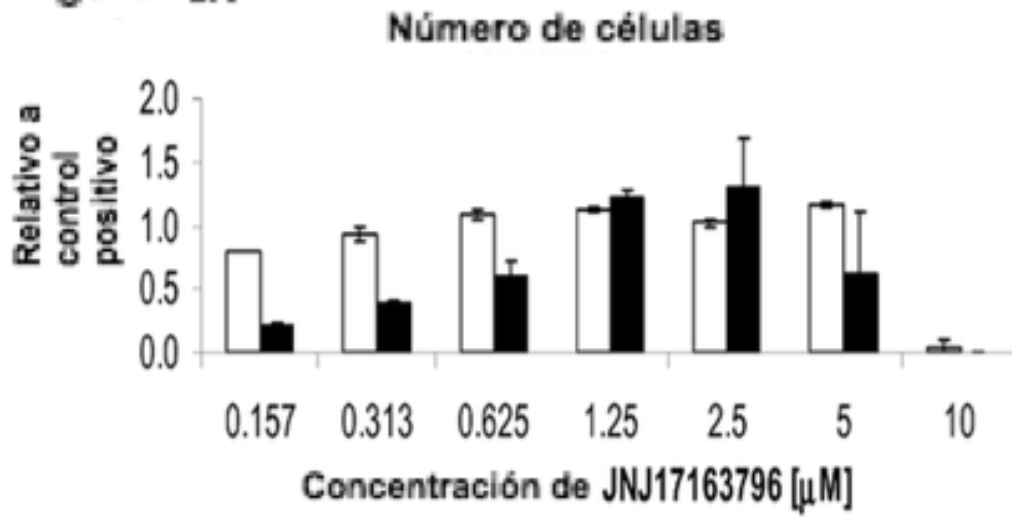


Figura 1B



**Figura 2A**



**Figura 2B**

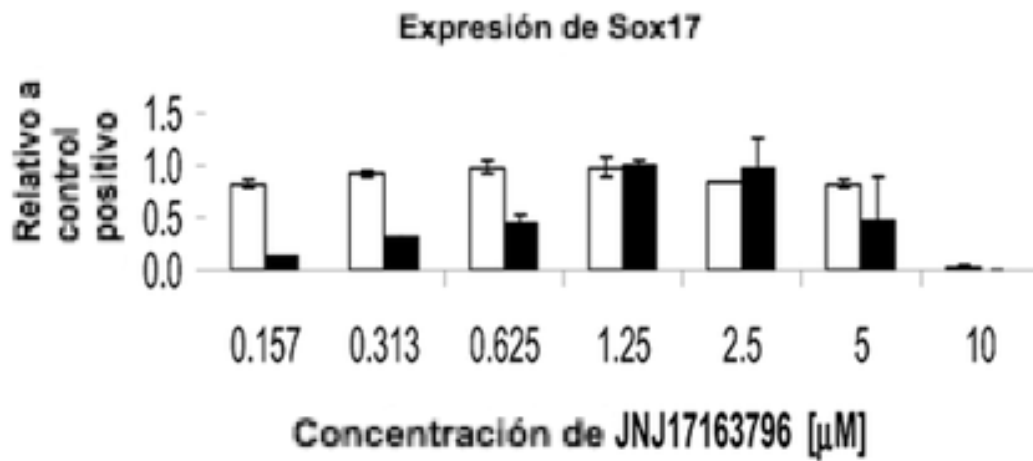


Figura 3A

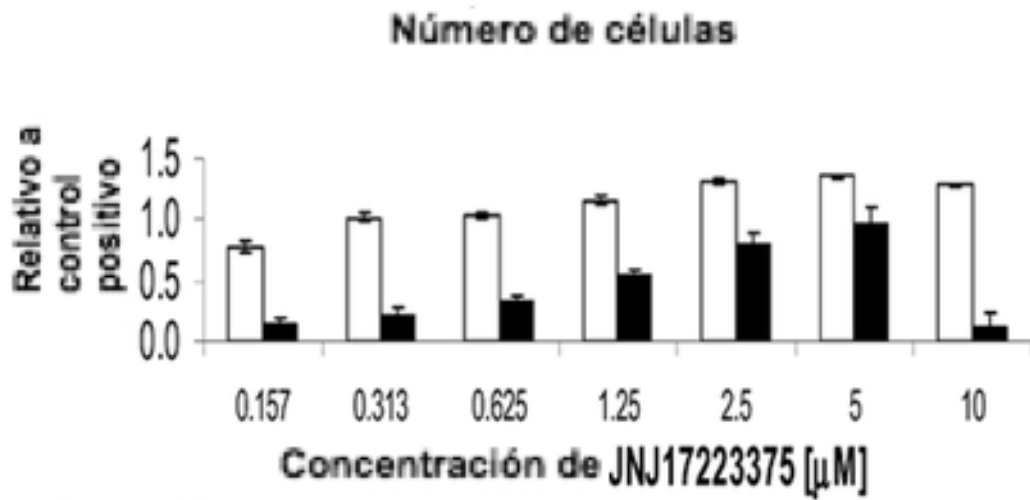
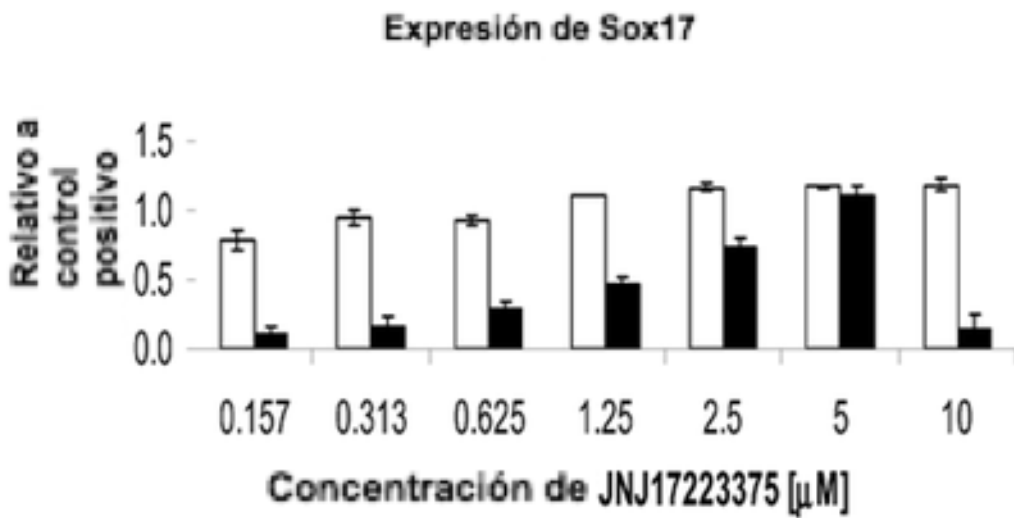
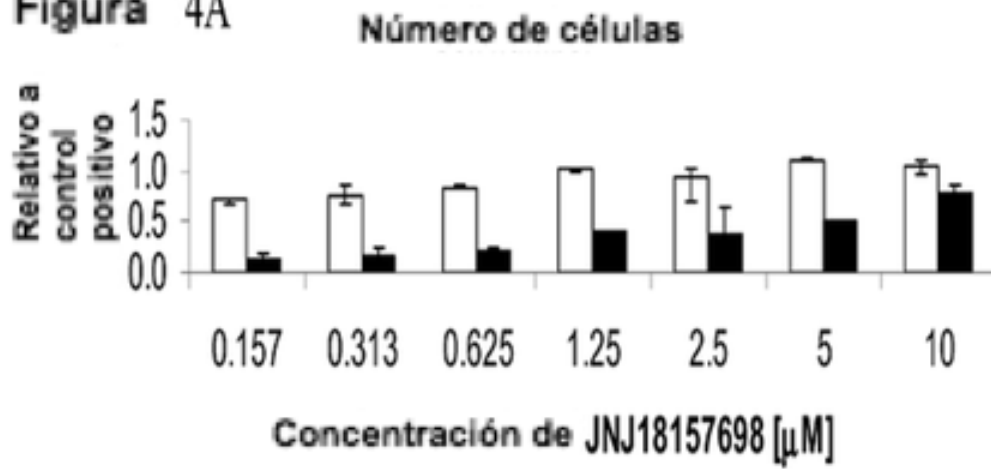


Figura 3B



**Figura 4A**



**Figura 4B**

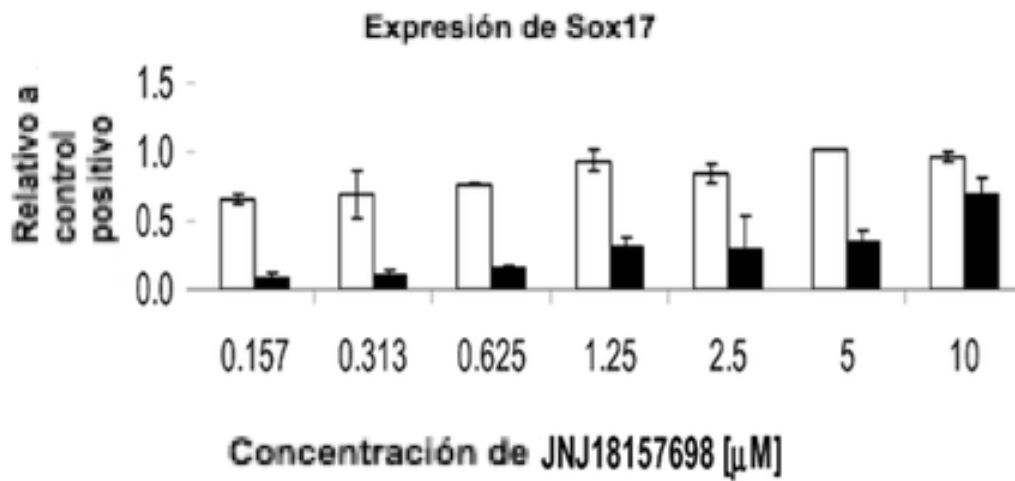


Figura 5A

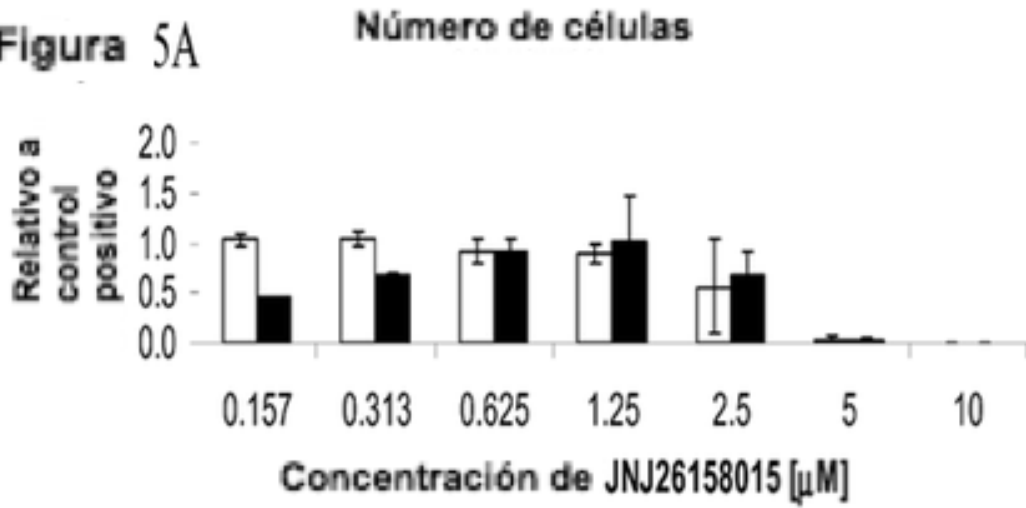


Figura 5B

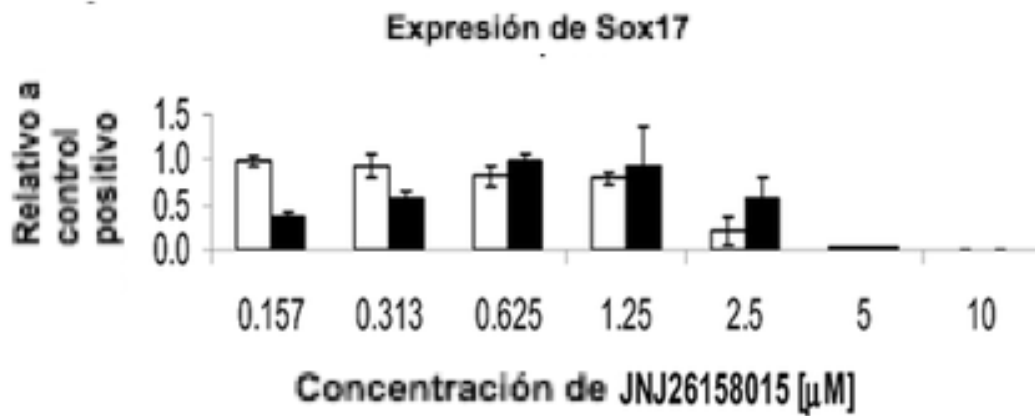


Figura 6A

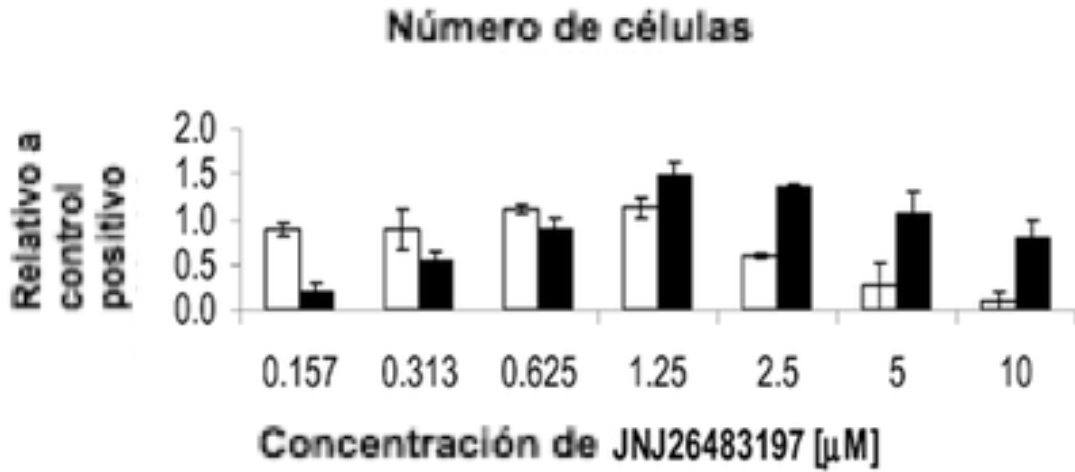


Figura 6B

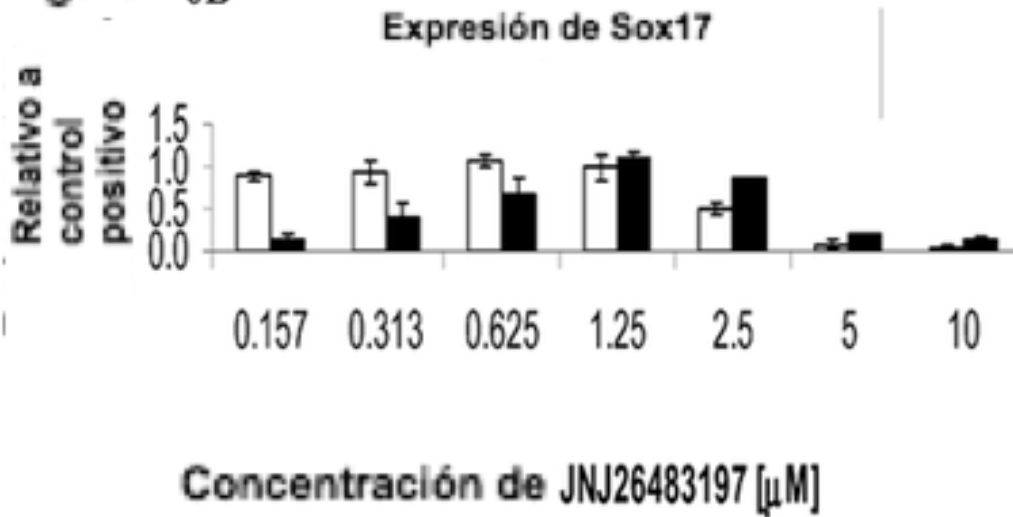




Figura 7A

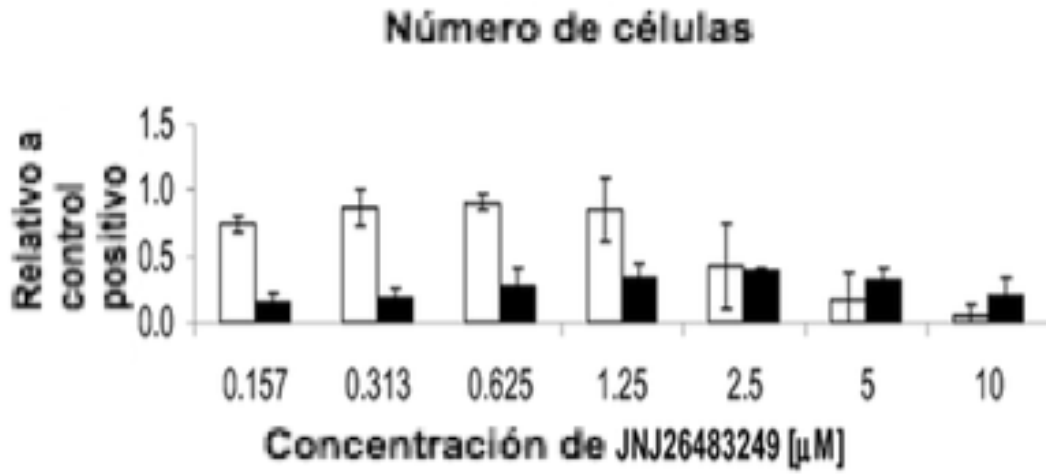


Figura 7B

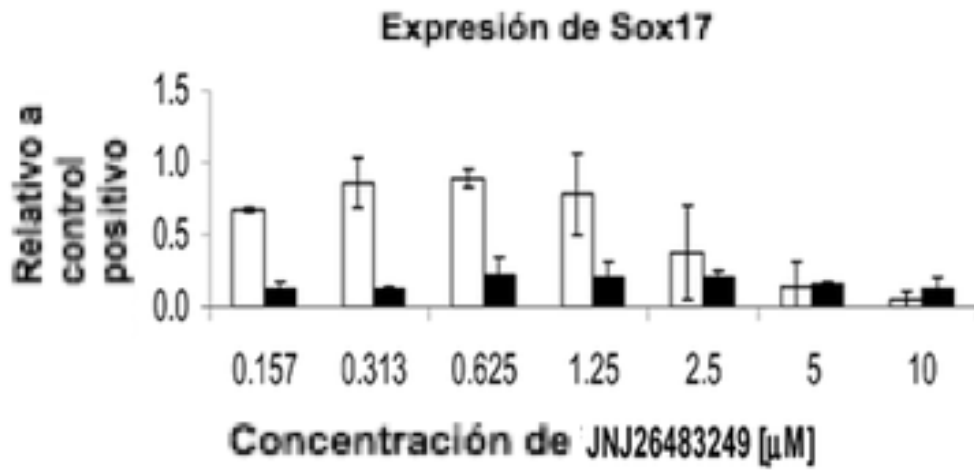


Figura 8A

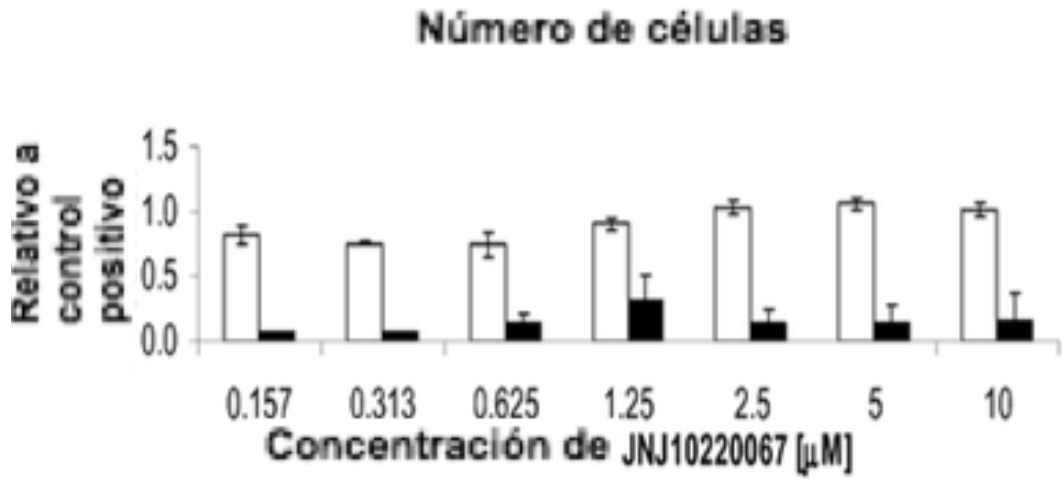


Figura 8B

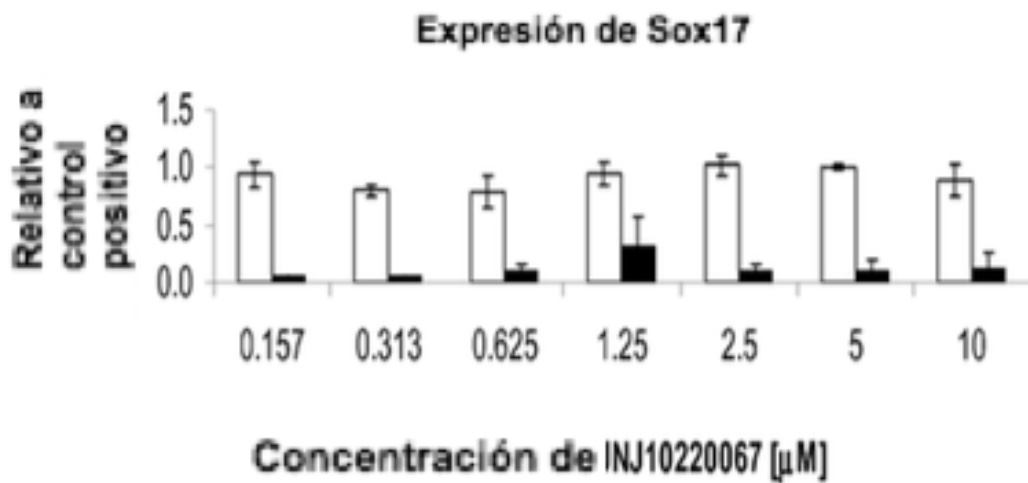


Figura 9

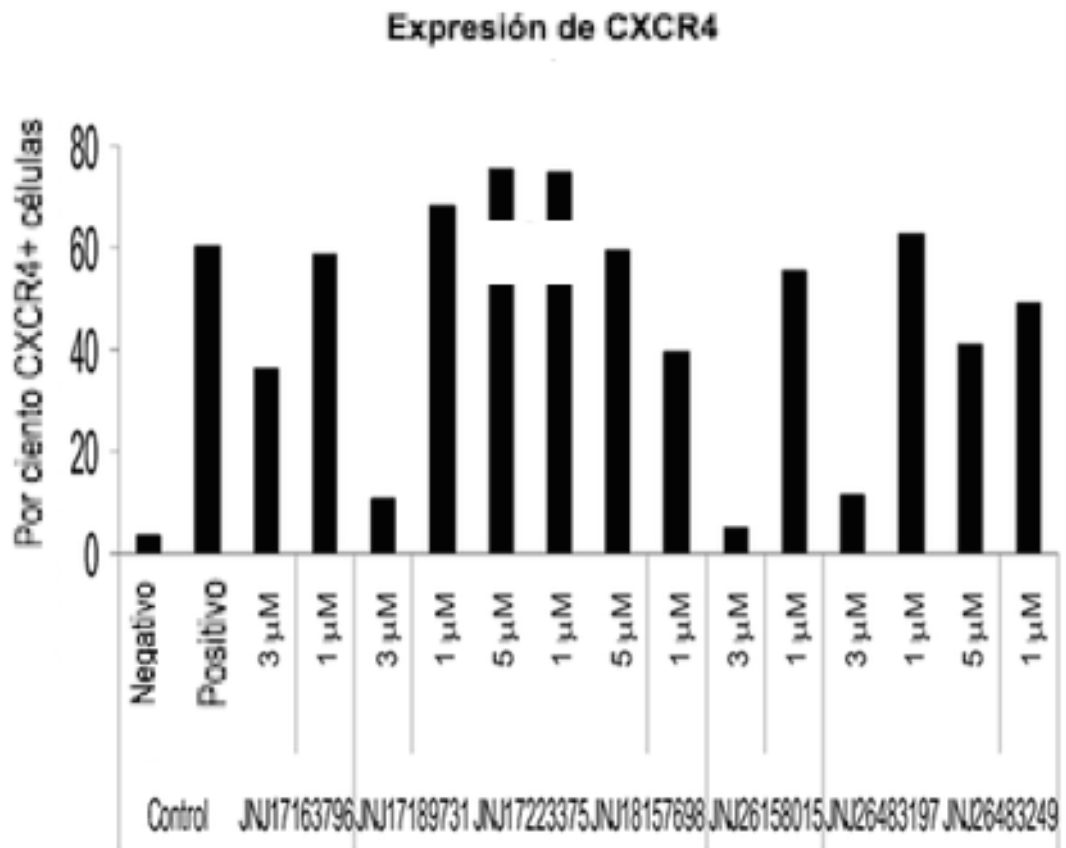


Figura 10-A

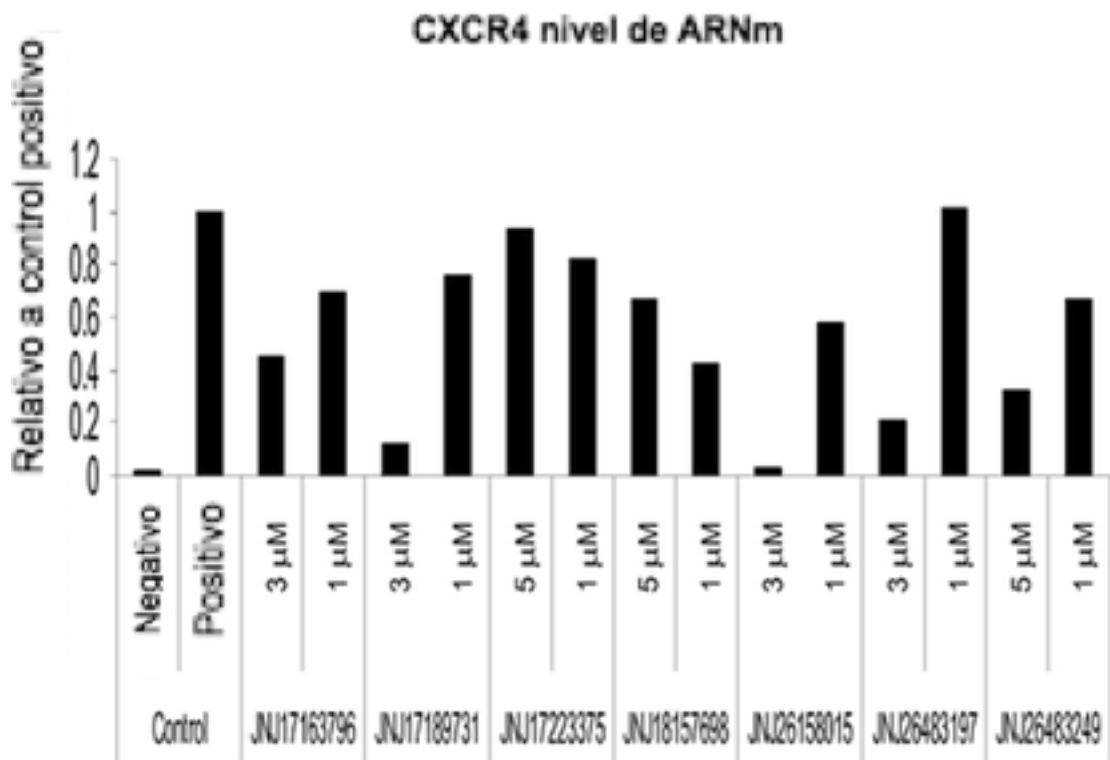


Figura 10-B

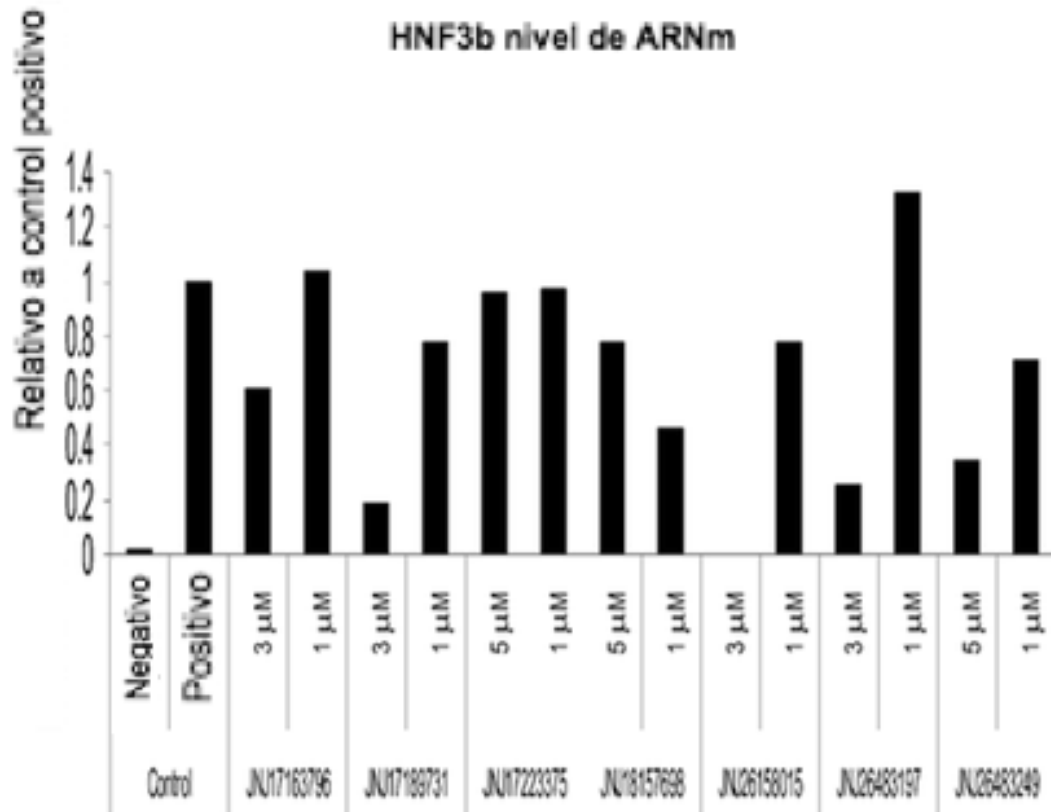


Figura 10-C

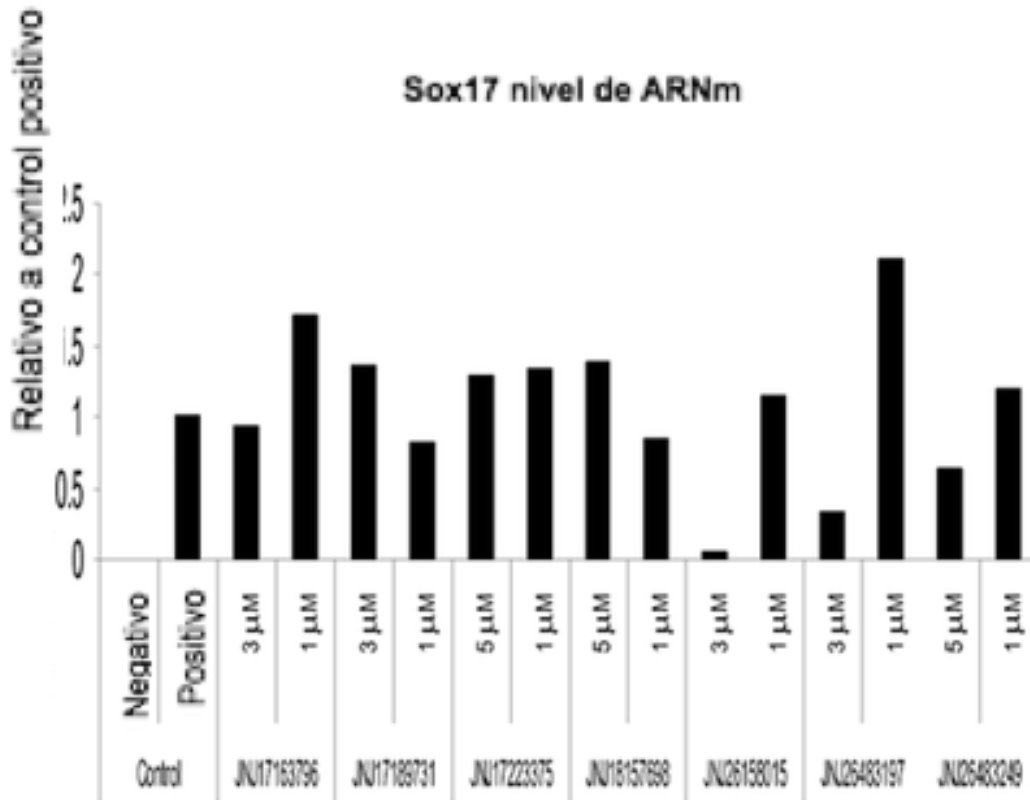


Figura 11-A

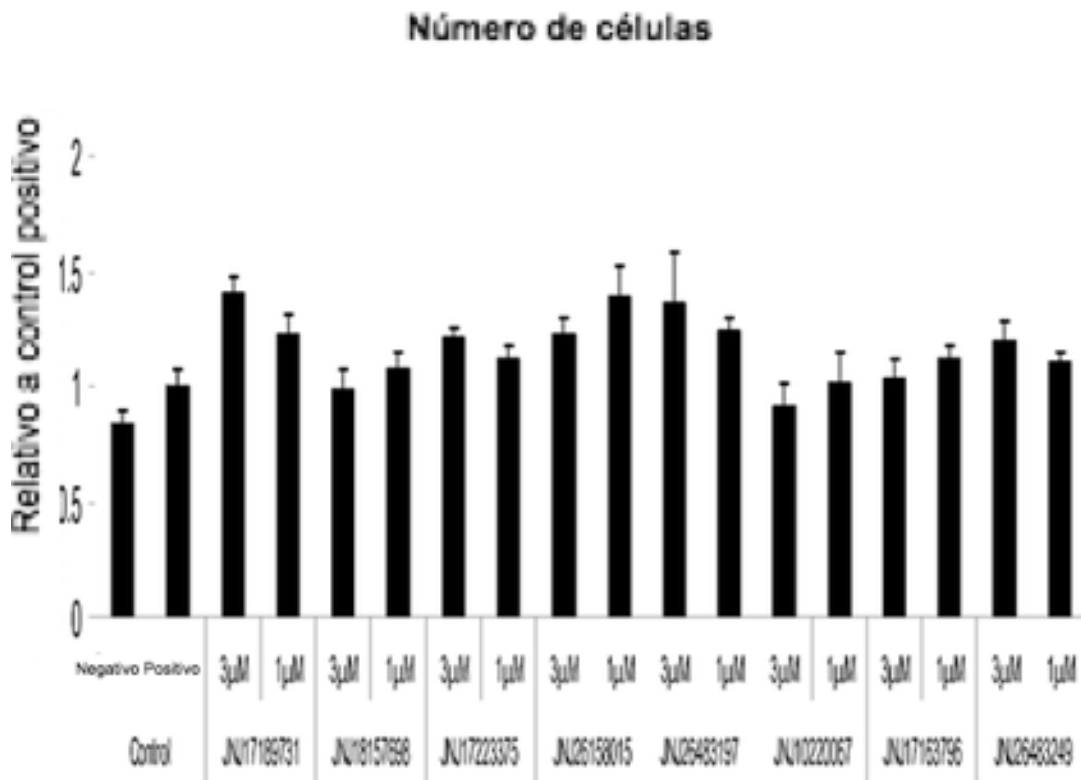


Figura 11-B

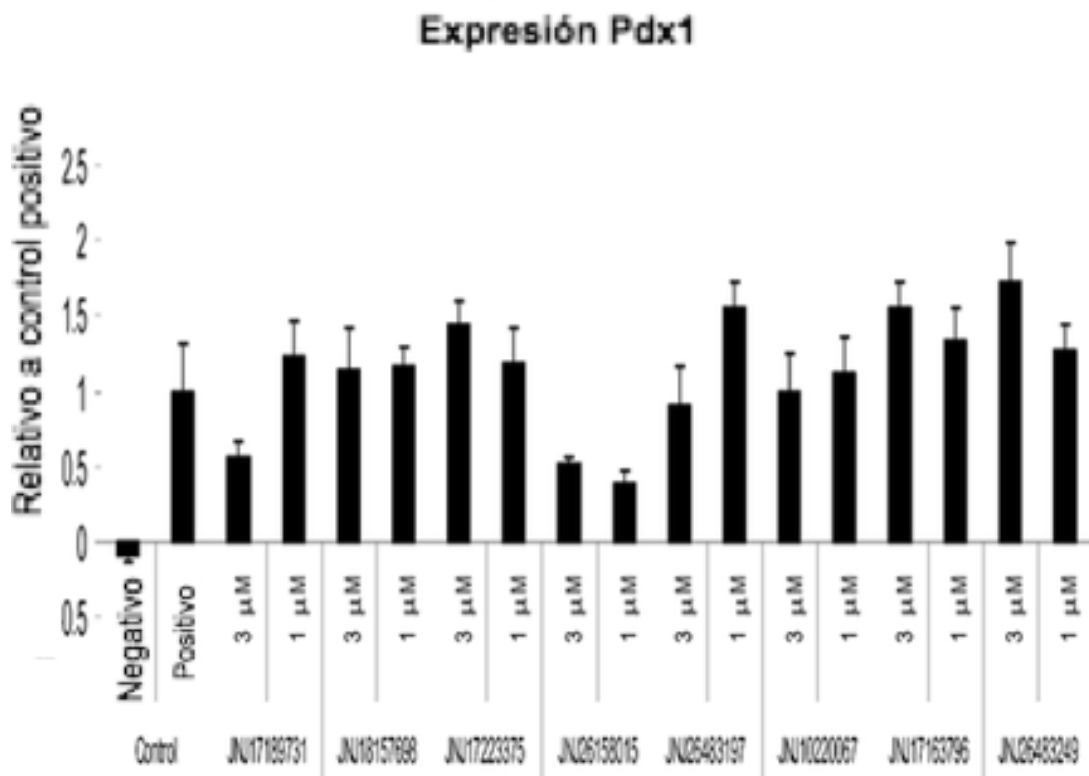




Figura 12

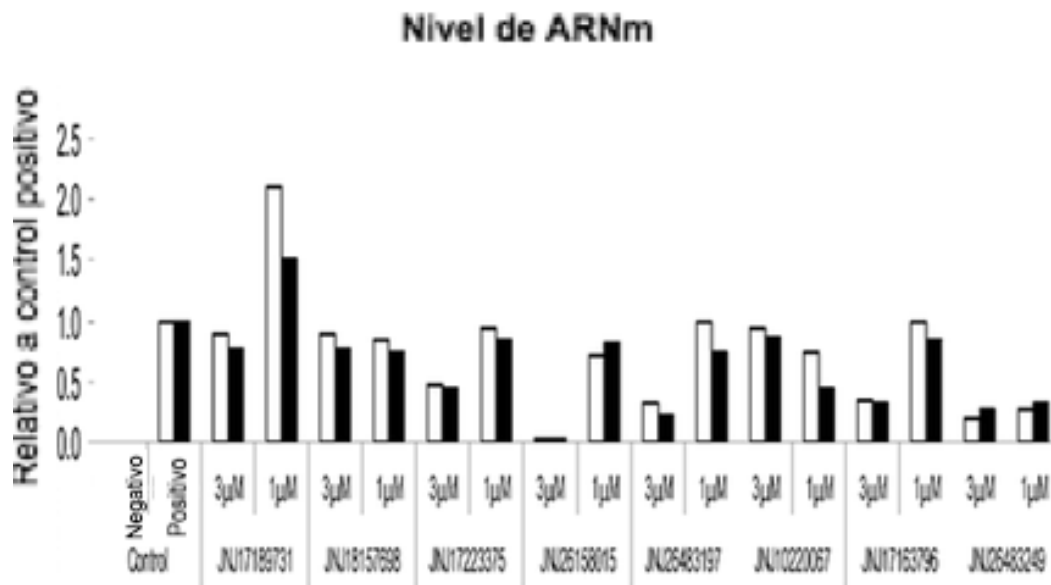


Figura 13-A

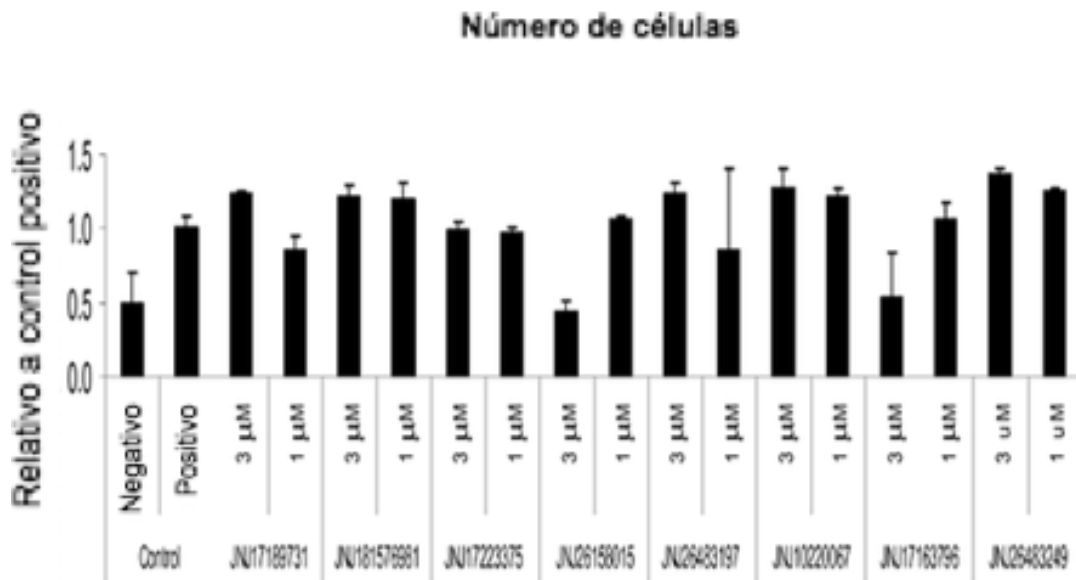


Figura 13-B

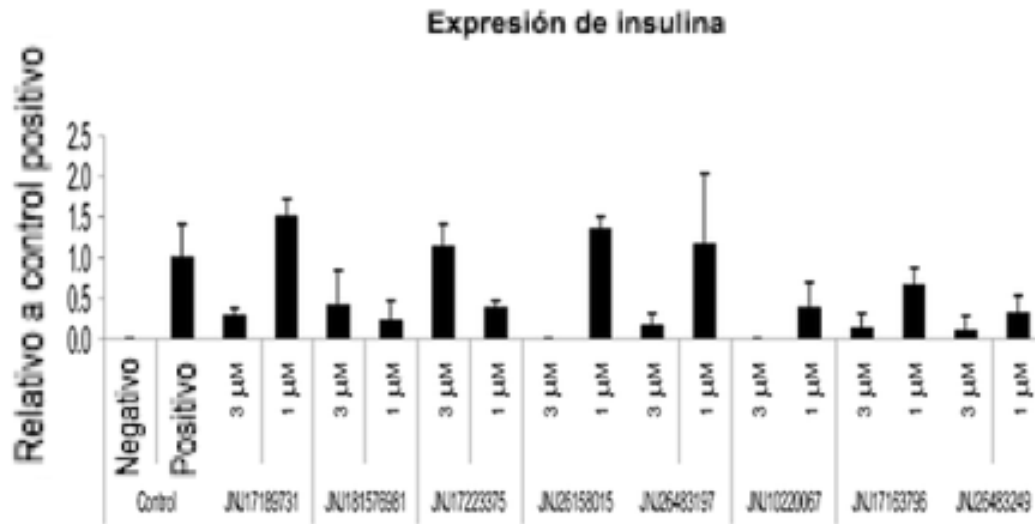


Figura 14

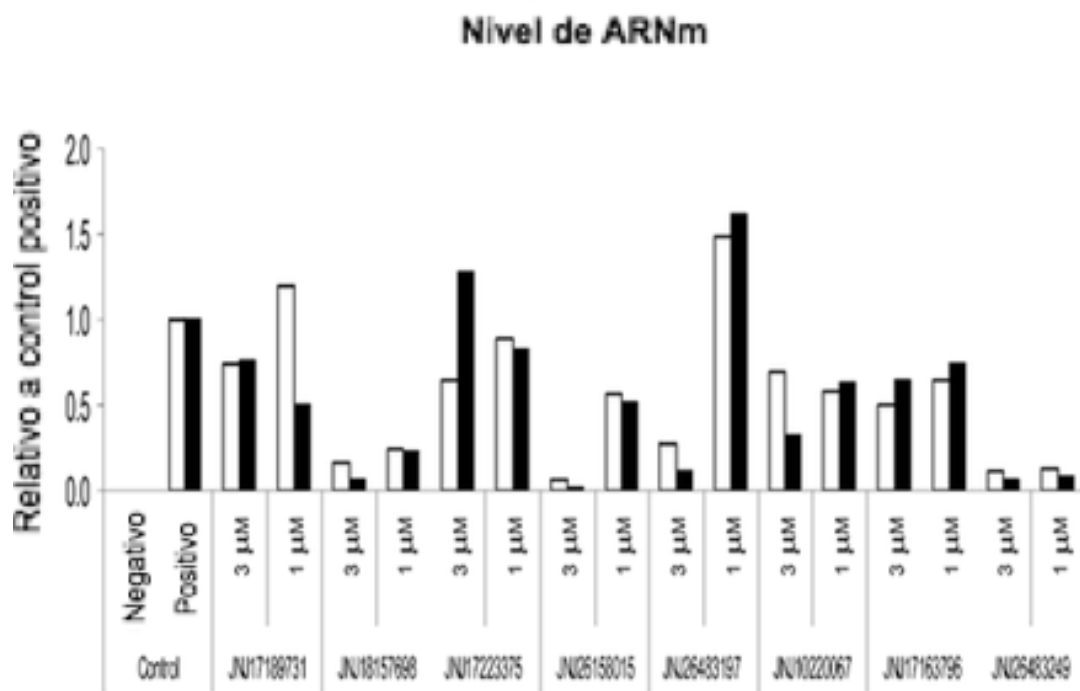


Figura 15-A

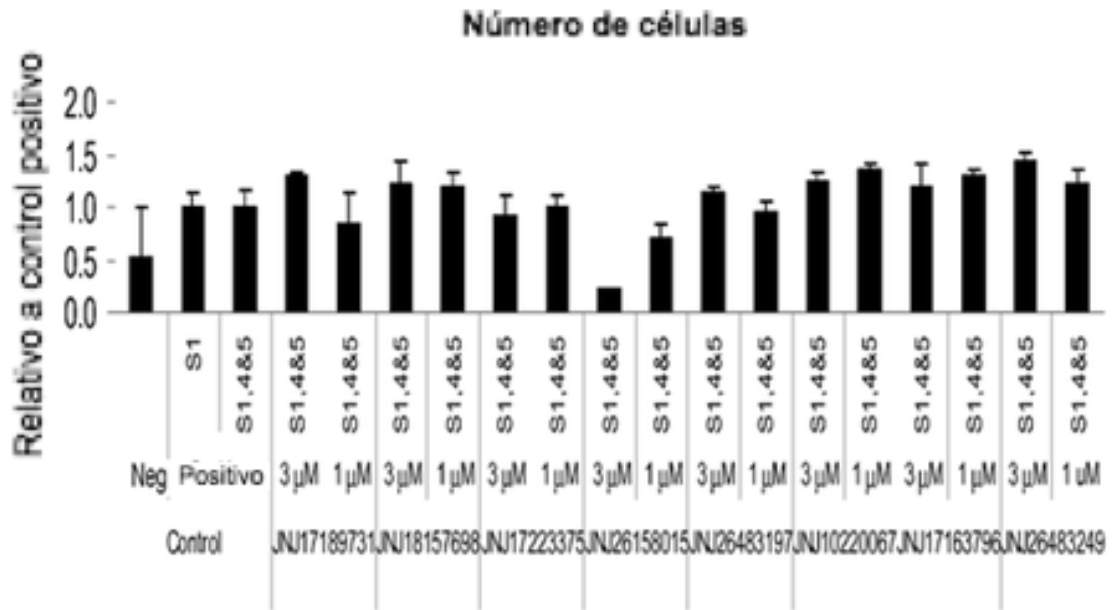


Figura 15-B

