

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 β , apropiadas para el injerto. Un enfoque es la generación de células funcionales β 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 β .

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 cultivan. 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 β) 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 β .

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 β -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/ β -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.

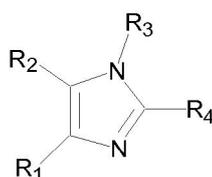
En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para expandir y diferenciar las células pluripotentes, que comprende las etapas de:

- 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.

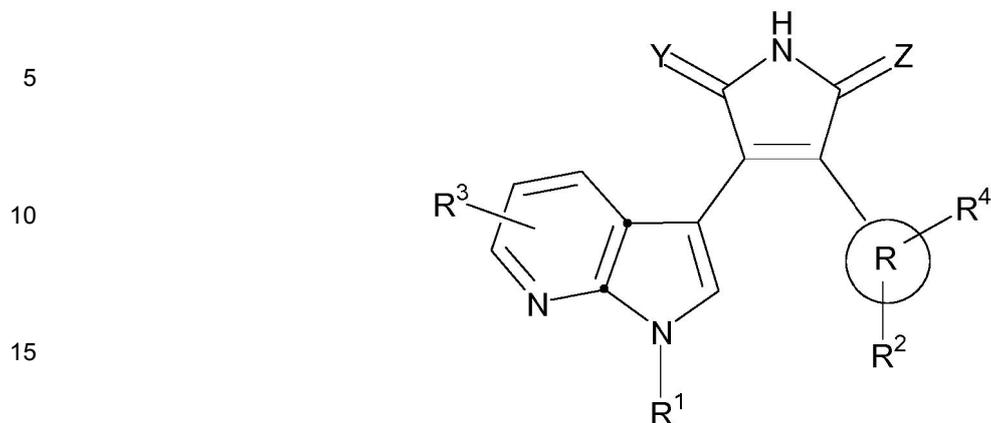
55 Las células pluripotentes pueden ser células madre embrionarias humanas, o pueden ser células que expresan marcadores de pluripotencia derivados de células madre embrionarias humanas, de acuerdo con los métodos descritos en 60/913475.

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



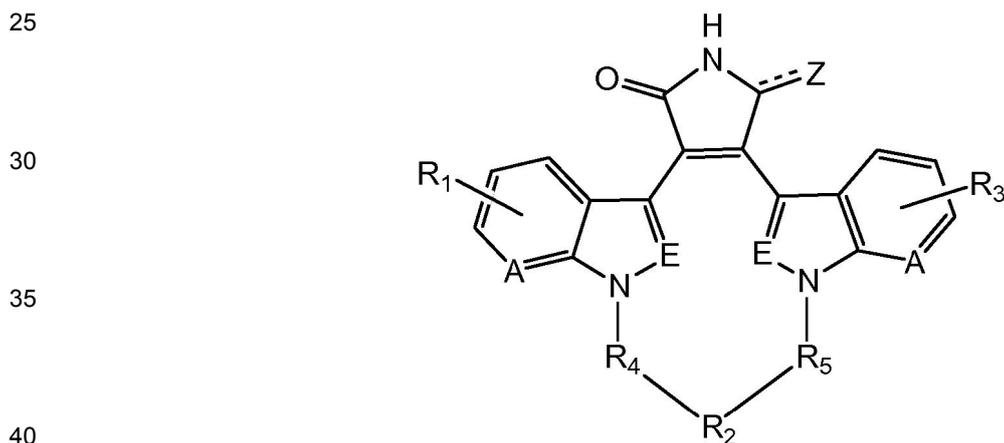
65 Formula (I)

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

50 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).

55 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).

60 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).

65 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.

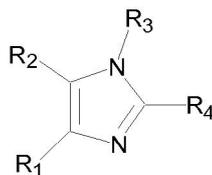
Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, Hnf-3beta, GSC, Cerl, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA-6, CXCR4, C-Kit, CD99, y OTX2. Contemplada en la 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:

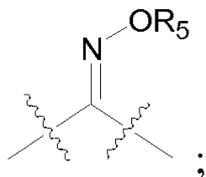
R₁ es fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes de fenilo se seleccionan del grupo que consiste de alquilo C₁₋₅, halógeno, nitro, trifluorometilo y nitrilo, o pirimidinilo;

R₂ es fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes de fenilo se seleccionan del grupo que consiste de alquilo C₁₋₅, halógeno, nitro, trifluorometilo y nitrilo, o pirimidinilo que está opcionalmente sustituido por alquilo C₁₋₄, y por lo menos uno de R₁ y R₂ es pirimidinilo.

R₃ es hidrógeno, 2-(trimetisilil)etoximetilo, alcoxicarbonilo C₁₋₅, ariloxicarbonilo, arilo alquilcarbonilo C₁₋₅, arilo alquilo C₁₋₅, arilo alquilo C₁₋₅ sustituido en donde uno o más de los sustituyentes de arilo se seleccionan independientemente del grupo que consiste de alquilo C₁₋₅, alcoxi C₁₋₅, halógeno, amino, alquilamino C₁₋₅, y di alquilamino C₁₋₅, ftalimido alquilo C₁₋₅, amino alquilo C₁₋₅, diamino alquilo C₁₋₅, succinimido alquilo C₁₋₅, alquilcarbonilo C₁₋₅, arilcarbonilo, alquilcarbonilo C₁₋₅ alquilo C₁₋₅ y ariloxicarbonilo alquilo C₁₋₅;

R₄ es -(A)-(CH₂)_q-X;

A es vinileno, etinileno o



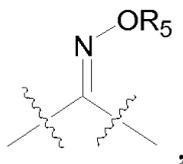
R₅ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₅, fenilo y fenil alquilo C₁₋₅;

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 C₁₋₅, alquilo C₁₋₅ sustituido en donde el uno o más sustituyentes de alquilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alcoxi C₁₋₅, trihaloalquilo, ftalimido y amino, cicloalquilo C₃₋₇, alcoxi C₁₋₅, alcoxi C₁₋₅ 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 C₁₋₅, halógeno y alcoxi C₁₋₅, fenilo, fenilo sustituido en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alquilo C₁₋₅, halógeno y alcoxi C₁₋₅, arilo alquilo C₁₋₅, arilo alquilo C₁₋₅ sustituido en donde el uno o más sustituyentes de arilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alquilo C₁₋₅, halógeno y alcoxi C₁₋₅, ariloxi alquilamino C₁₋₅, alquilamino C₁₋₅, di alquilamino C₁₋₅, nitrilo, oxima, benziloxiimino, alquiloxiimino C₁₋₅, ftalimido, succinimido, alquilcarboniloxi C₁₋₅, fenilcarboniloxi, fenilcarboniloxi sustituido en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se selecciona cada uno del grupo que consiste de alquilo C₁₋₅, halógeno y alcoxi C₁₋₅, fenilo alquilarconiloxi C₁₋₅, en donde el uno o más sustituyentes de fenilo se seleccionan cada uno del grupo que consiste de alquilo C₁₋₅, halógeno y alcoxi C₁₋₅, aminocarboniloxi, alquilaminocarboniloxi C₁₋₅, di alquilaminocarboniloxi C₁₋₅, alcoxicarboniloxi C₁₋₅, alcoxicarboniloxi C₁₋₅ 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 C₁₋₅, alcoxi C₁₋₅, y halógeno, alquiltio C₁₋₅, alquiltio C₁₋₅ sustituido en donde los sustituyentes de alquilo se seleccionan del grupo que consiste de hidroxilo y ftalimido, alquilsulfonilo C₁₋₅, 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 C₁₋₅ y trifluorometilo con la condición de que si A es

5



10

q sea 0 y X sea H, entonces R₃ no puede ser 2-(trimetilsilil)etoximetil; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

15

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que R₁ es fenilo sustituido y R₂ es pirimidin-3-il.

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que R₁ es 4-fluorofenilo

20

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que R₃ es hidrógeno, arilo alquilo C₁₋₅, o arilo alquilo C₁₋₅ sustituido.

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que R₃ es hidrógeno o fenilo alquilo C₁₋₅.

25

Un ejemplo incluye un compuesto de Fórmula (I) en el que X es succinimido, hidroxil, metilo, fenilo, alquilsulfonilo C₁₋₅, cicloalquilo C₃₋₆, alquilcarbonilo C₁₋₅, alcoxi C₁₋₅, fenilcarbonilo, alquilamino C₁₋₅, di alquilamino C₁₋₅ 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

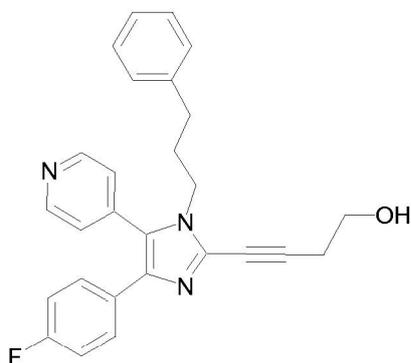
1	5(4)-(4-fluorofenil)-4(5)-(4-piridil)imidazol,
2	4-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,
3	5-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-4-(4-piridil)imidazol,
4	4-(4-fluorofenil)-2-iodo-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,
5	4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxitubut-1-il)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,
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)etil-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	2-(5-cloropentin-1-il)-4-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,
17	4-(4-fluorofenil)-2-(4-N-fenilcarbamoiloxibutin-1-il)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol,
18	2-(4-clorobutin-1-il)-4-(4-fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-(4-piridil)imidazol, y
	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

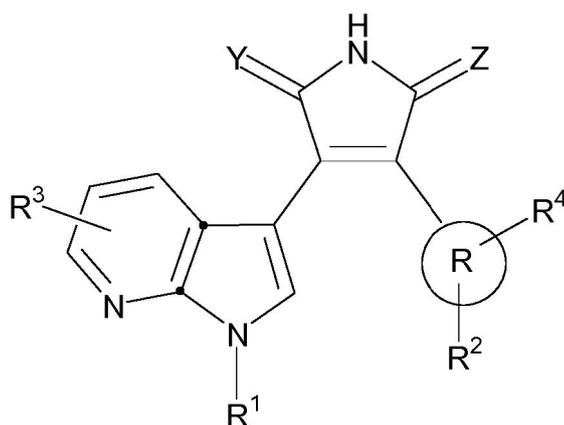
En una divulgación, el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B es un compuesto de Fórmula (II):

25

30

35

40



Formula (II)

en la que:

45

R se selecciona del grupo que consiste de R_a, alquilo-C₁₋₈-R_a, alqueno-C₂₋₈-R_a, alquino-C₂₋₈-R_a y ciano;

R_a se selecciona del grupo que consiste de cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo;

50

R¹ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo-C₁₋₈-R⁵, alqueno-C₂₋₈-R⁵, alquino-C₂₋₈-R⁵, -C(O)-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -C(O)-arilo-R⁸, -C(O)-O-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -C(O)-O-arilo-R⁸, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₈-R⁹), -C(O)-NH(arilo-R⁸), -C(O)-N(alquilo C₁₋₈-R⁹)₂, -SO₂-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -SO₂-arilo-R⁸, -cicloalquilo-R⁶, -heterociclilo-R⁶, -arilo-R⁶ y -heteroarilo-R⁶; 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

60

65

R⁵ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -O-(C₁₋₈)alquilo, -O-(C₁₋₈)alquilo-OH, -O-(C₁₋₈)alquilo-O-(C₁₋₈)alquilo, -O-(C₁₋₈)alquilo-NH₂, -O-(C₁₋₈)alquilo-NH(alquilo C₁₋₈), -O-(C₁₋₈)alquilo-N(alquilo C₁₋₈)₂, -O-(C₁₋₈)alquilo-S-(C₁₋₈)alquilo, -O-(C₁₋₈)alquilo-SO₂-(C₁₋₈)alquilo, -O-(C₁₋₈)alquilo-SO₂-NH₂, -O-(C₁₋₈)alquilo-SO₂-NH(alquilo C₁₋₈), -O-(C₁₋₈)alquilo-SO₂-N(alquilo C₁₋₈)₂, -O-C(O)H, -O-C(O)-(C₁₋₈)alquilo, -O-C(O)-NH₂, -OC(O)-NH(alquilo C₁₋₈), -O-C(O)-N(alquilo C₁₋₈)₂, -O-(C₁₋₈)alquilo-C(O)H, -O-(C₁₋₈)alquilo-C(O)-(C₁₋₈)alquilo, -O-(C₁₋₈)alquilo-CO₂H, -O-(C₁₋₈)alquilo-C(O)-O-(C₁₋₈)alquilo, -O-(C₁₋₈)alquilo-C(O)-NH₂, -O-(C₁₋₈)alquilo-C(O)-NH(alquilo C₁₋₈), -O-(C₁₋₈)alquilo-C(O)-N(alquilo C₁₋₈)₂, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₈)alquilo, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₈)alquilo, -C(O)-NH₂, -C(NH)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₈), -C(O)-N(alquilo C₁₋₈)₂, -SH, -S-(C₁₋₈)alquilo, -S-(C₁₋₈)alquilo-S-(C₁₋₈)alquilo, -S-(C₁₋₈)alquilo-O-(C₁₋₈)alquilo, -S-(C₁₋₈)alquilo-O-(C₁₋₈)alquilo-OH, -S-(C₁₋₈)alquilo-O-(C₁₋₈)alquilo-NH₂, -S-(C₁₋₈)alquilo-O-(C₁₋₈)alquilo-NH(alquilo C₁₋₈), -S-(C₁₋

$_{8}$ alquilo-O-(C₁₋₈)alquilo-N(Alquilo C₁₋₈)₂, -S-(C₁₋₈)alquilo-NH(Alquilo C₁₋₈), -SO₂-(C₁₋₈)alquilo, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(Alquilo C₁₋₈), -SO₂-N(Alquilo C₁₋₈)₂, -N-R⁷, ciano, (halo)₁₋₃, hidroxilo, nitro, oxo, -cicloalquilo-R⁶, -heterociclilo-R⁶, -arilo-R⁶ y -heteroarilo-R⁶;

5 R⁶ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₈, alqueno-C₂₋₈, alquino-C₂₋₈, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₈)alquilo, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₈)alquilo, -C(O)-NH₂, -C(NH)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₈), -C(O)-N(C₁₋₈)alquilo₂, -SO₂-(C₁₋₈)alquilo, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(alquilo C₁₋₈), -SO₂-N(alquilo C₁₋₈)₂, -(C₁₋₈)alquilo-N-R⁷, -(C₁₋₈)alquilo-(halo)₁₋₃, -(C₁₋₈)alquilo-OH, -arilo-R⁸, -(C₁₋₈)alquilo-arilo-R⁸ y -(C₁₋₈)alquilo-heteroarilo-R⁸; con la condición que cuando R⁶ esté unido a un átomo de carbono, R⁶ se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de alcoxi-C₁₋₈, -

10 (C₁₋₈)alcoxi-(halo)₁₋₃, -SH, -S-(C₁₋₈)alquilo, -N-R⁷, ciano, halo, hidroxilo, nitro, oxo y -heteroarilo-R⁸;

15 R⁷ es 2 sustituyentes seleccionados independientemente, del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₈, -alqueno C₂₋₈, -alquino C₂₋₈, -(C₁₋₈)alquilo-OH, -(C₁₋₈)alquilo-O-(C₁₋₈)alquilo, -(C₁₋₈)alquilo-NH₂, -(C₁₋₈)alquilo-NH(alquilo C₁₋₈), -(C₁₋₈)alquilo-N(alquilo C₁₋₈)₂, -(C₁₋₈)alquilo-S-(C₁₋₈)alquilo, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₈)alquilo, -C(O)-O-(C₁₋₈)alquilo, -C(O)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₈), -C(O)-N(alquilo C₁₋₈)₂, -SO₂-(C₁₋₈)alquilo, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(alquilo C₁₋₈), -SO₂-N(alquilo C₁₋₈)₂, -C(N)-NH₂, -cicloalquilo-R⁸, -(C₁₋₈)alquilo-heterociclilo-R⁸, -arilo-R⁸, -(C₁₋₈)alquilo-arilo-R⁸ y -(C₁₋₈)alquilo-heteroarilo-R⁸;

20 R⁸ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno -alquilo C₁₋₈, -(C₁₋₈)alquilo-(halo)₁₋₃ y -(C₁₋₈)alquilo-OH; con la condición de que cuando R⁸ está unido a un átomo de carbono, R⁸ se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C₁₋₈, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₈), -N(alquilo C₁₋₈)₂, ciano, halo, -(C₁₋₈)alcoxi-(halo)₁₋₃, hidroxilo y nitro;

25 R⁹ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alcoxi C₁₋₈, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₈), -N(alquilo C₁₋₈)₂, ciano, (halo)₁₋₃, hidroxilo y nitro;

30 R₂ es un sustituyente unido a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de -alquilo C₁₋₈-R⁵, -alqueno C₂₋₈-R⁵, -alquino C₂₋₈-R⁵, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -C(O)-NH₂, -C(O)-NH(Alquilo C₁₋₈-R⁹), -C(O)-N(alquilo C₁₋₈-R⁹)₂, -C(O)-NH(arilo-R⁸), -C(O)-cicloalquilo-R⁸, -C(O)-heterociclilo-R⁸, -C(O)-arilo-R⁸, -C(O)-heteroarilo-R⁸, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -C(O)-O-arilo-R⁸, -SO₂-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -SO₂-arilo-R⁸, -cicloalquilo-R⁶, -arilo-R⁶ y -(C₁₋₈)alquilo-N-R⁷; con la condición de que, cuando R₂ esté unido a un átomo de carbono, R₂ se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C₁₋₈-R⁵, -N-R⁷, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, oxo, -heterociclilo-R⁶ y -heteroarilo-R⁶;

35 R³ es 1 a 3 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₈-R¹⁰, -alqueno C₂₋₈-R¹⁰, -alquino C₂₋₈-R¹⁰, -alcoxi C₁₋₈-R¹⁰, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -C(O)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₈-R⁹), -C(O)-N(alquilo C₁₋₈-R⁹)₂, -C(O)-cicloalquilo-R⁸, -C(O)-heterociclilo-R⁸, -C(O)-arilo-R⁸, -C(O)-heteroarilo-R⁸, -C(NH)-NH₂, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -C(O)-O-arilo-R⁸, -SO₂-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -SO₂-arilo-R⁸, -N-R⁷, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo-R⁸, -heterociclilo-R⁸, -arilo-R⁸ y -heteroarilo-R⁸;

40 R⁴ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₈-R¹⁰, -alqueno C₂₋₈-R¹⁰, -alquino C₂₋₈-R¹⁰, -alcoxi C₁₋₈-R¹⁰, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -C(O)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₈-R⁹), -C(O)-N(alquilo C₁₋₈-R⁹)₂, -C(O)-cicloalquilo-R⁸, -C(O)-heterociclilo-R⁸, -C(O)-arilo-R⁸, -C(O)-heteroarilo-R⁸, -C(NH)-NH₂, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -C(O)-O-arilo-R⁸, -SH, -S-(C₁₋₈)alquilo-R¹⁰, -SO₂-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -SO₂-arilo-R⁸, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(alquilo C₁₋₈-R⁹), -SO₂-N(alquilo C₁₋₈-R⁹)₂, -N-R⁷, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo-R⁸, -heterociclilo-R⁸, -arilo-R⁸ y -heteroarilo-R⁸;

45 R¹⁰ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₈), -N(alquilo C₁₋₈)₂, ciano, (halo)₁₋₃, 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_a, -alquilo C₁₋₄-R_a, -alqueno C₂₋₄-R_a, alquino C₂₋₄-R_a, y ciano.

60 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II), en donde R_a se selecciona del grupo que consiste de heterociclilo, arilo y heteroarilo.

65 En una divulgación, R_a se selecciona del grupo que consiste de dihidro-pirano, fenilo, hafilo, tienilo, pirrolo, imidazolilo, pirazolilo, piridinilo, azaindolilo, indazolilo, benzofurilo, benzotienilo, dibenzofurilo y dibenzotienilo.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde R¹ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno -alquilo C₁₋₄-R⁵, -alqueno C₂₋₄-R⁵, -alquino C₂₋₄-R⁵, -C(O)-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -C(O)-arilo-R⁸, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -C(O)-O-arilo-R⁸, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₄-R⁹), -C(O)-NH(arilo-R⁸), -C(O)-N(alquilo C₁₋₄-R⁹)₂, -SO₂-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -SO₂-arilo-R⁸, -cicloalquilo-R⁶, -heterociclilo-R⁶, -arilo-R⁶ y -heteroarilo-R⁶; 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, R¹ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R⁵, -arilo-R⁶ y -heteroarilo-R⁶; 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, R¹ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R⁵ y -naftilo-R⁶.

En la presente se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R⁵ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -O-(C₁₋₄)alquilo, -O-(C₁₋₄)alquilo-OH, -O-(C₁₋₄)alquilo-O-(C₁₋₄)alquilo, -O-(C₁₋₄)alquilo-NH₂, -O-(C₁₋₄)alquilo-NH(Alquilo C₁₋₄), -O-(C₁₋₄)alquilo-N(Alquilo C₁₋₄)₂, -O-(C₁₋₄)alquilo-S-(C₁₋₄)alquilo, -O-(C₁₋₄)alquilo-SO₂-(C₁₋₄)alquilo, -O-(C₁₋₄)alquilo-SO₂-NH₂, -O-(C₁₋₄)alquilo-SO₂-NH(alquilo C₁₋₄), -O-(C₁₋₄)alquilo-SO₂-N(alquilo C₁₋₄)₂, -O-C(O)H, -OC(O)-(C₁₋₄)alquilo, -O-C(O)-NH₂, -O-C(O)-NH(alquilo C₁₋₄), -O-C(O)-N(alquilo C₁₋₄)₂, -O-(C₁₋₄)alquilo-C(O)H, -O-(C₁₋₄)alquilo-C(O)-(C₁₋₄)alquilo, -O-(C₁₋₄)alquilo-CO₂H, -O-(C₁₋₄)alquilo-C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo, -O-(C₁₋₄)alquilo-C(O)-NH₂, -O-(C₁₋₄)alquilo-C(O)-NH(alquilo C₁₋₄), -O-(C₁₋₄)alquilo-C(O)-N(alquilo C₁₋₄)₂, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₄)alquilo, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo, -C(O)-NH₂, -C(NH)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₄), -C(O)-N(alquilo C₁₋₄)₂, -SH, -S-(C₁₋₄)alquilo, -S-(C₁₋₄)alquilo-S-(C₁₋₄)alquilo, -S-(C₁₋₄)alquilo-O-(C₁₋₄)alquilo, -S-(C₁₋₄)alquilo-O-(C₁₋₄)alquilo-OH, -S-(C₁₋₄)alquilo-O-(C₁₋₄)alquilo-NH₂, -S-(C₁₋₄)alquilo-O-(C₁₋₄)alquilo-NH(alquilo C₁₋₄), -S-(C₁₋₄)alquilo-O-(C₁₋₄)alquilo-N(alquilo C₁₋₄)₂, -S-(C₁₋₄)alquilo-NH(alquilo C₁₋₄), -SO₂-(C₁₋₄)alquilo, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(alquilo C₁₋₄), -SO₂-N(Alquilo C₁₋₄)₂, -N-R⁷, ciano, (halo)1-3, hidroxilo, nitro, oxo, -cicloalquilo-R⁶, -heterociclilo-R⁶, -arilo-R⁶ y -heteroarilo-R⁶.

En una divulgación, R₅ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -O-(C₁₋₄)alquilo, -N-R⁷, hidroxilo y -heteroarilo-R⁶.

En una divulgación, R₅ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -O-(C₁₋₄)alquilo, -N-R⁷, hidroxilo, -imidazolilo-R⁶, -triazolilo-R⁶ y -tetrazolilo-R⁶.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R⁶ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄, -alqueno C₂₋₄, -alquino C₂₋₄, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₄)alquilo, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo, -C(O)-NH₂, -C(NH)-NH₂, -C(O)-NH(Alquilo C₁₋₄), -C(O)-N(C₁₋₄)alquilo₂, -SO₂-(C₁₋₄)alquilo, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(alquilo C₁₋₄), -SO₂-N(alquilo C₁₋₄)₂, -(C₁₋₄)alquilo-N-R⁷, -(C₁₋₄)alquilo-(halo)₁₋₃, -(C₁₋₄)alquilo-OH, -arilo-R⁸, -(C₁₋₄)alquilo-arilo-R⁸ y -(C₁₋₄)alquilo-heteroarilo-R⁸; con la condición de que, cuando R⁶ está unido a un átomo de carbono, R⁶ se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C₁₋₄, -(C₁₋₄)alcoxi-(halo)₁₋₃, -SH, -S-(C₁₋₄)alquilo, -N-R⁷, ciano, halo, hidroxilo, nitro, oxo y -heteroarilo-R⁸.

En un ejemplo, R⁶ es hidrógeno.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R⁷ es 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄, -alqueno C₂₋₄, -alquino C₂₋₄, -(C₁₋₄)alquilo-OH, -(C₁₋₄)alquilo-O-(C₁₋₄)alquilo, -(C₁₋₄)alquilo-NH₂, -(C₁₋₄)alquilo-NH(Alquilo C₁₋₄), -(C₁₋₄)alquilo-N(alquilo C₁₋₄)₂, -(C₁₋₄)alquilo-S-(C₁₋₄)alquilo, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₄)alquilo, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo, -C(O)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₄), -C(O)-N(alquilo C₁₋₄)₂, -SO₂-(C₁₋₄)alquilo, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(alquilo C₁₋₄), -SO₂-N(alquilo C₁₋₄)₂, -C(N)-NH₂, -cicloalquilo-R⁸, -(C₁₋₄)alquilo-heterociclilo-R⁸, -arilo-R⁸, -(C₁₋₄)alquilo-arilo-R⁸ y -(C₁₋₄)alquilo-heteroarilo-R⁸.

En una divulgación R⁷ es 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₄)alquilo, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(alquilo C₁₋₄) y -SO₂-N(alquilo C₁₋₄)₂.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R⁸ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono o hidrógeno seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄, -(C₁₋₄)alquilo-(halo)₁₋₃ y -(C₁₋₄)alquilo-OH, con la condición que, cuando R⁸ está unido a un átomo de carbono, R⁸ se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C₁₋₄, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, ciano, halo, -(C₁₋₄)alcoxi-(halo)₁₋₃, hidroxilo y nitro.

En un ejemplo, R⁸ es hidrógeno.

En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R⁹ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alcoxi C₁₋₄, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -

N(alquilo C₁₋₄)₂, ciano, (halo)₁₋₃, hidroxilo y nitro.

En una divulgación, R⁹ es hidrógeno.

5 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R² es un sustituyente unido a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R⁵, -alquenoil C₂₋₄-R⁵, -alquinilo C₂₋₄-R⁵, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -C(O)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₄-R⁹), -C(O)-N(alquilo C₁₋₄-R⁹)₂, -C(O)-NH(arilo-R⁹), -C(O)-cicloalquilo-R⁸, -C(O)-heterociclilo-R⁸, -C(O)-arilo-R⁸, -C(O)-heteroarilo-R⁸, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -C(O)-O-arilo-R⁸, -SO₂-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -SO₂-arilo-R⁸, -cicloalquilo-R⁶, -arilo-R⁶ y -(C₁₋₄)alquilo-N-R⁷; con la condición de que, cuando R² esté unido a un átomo de carbono, R² se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C₁₋₄-R⁵, -N-R⁷, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, oxo, -heterociclilo-R⁶ y -heteroarilo-R⁶.

15 En una divulgación, R₂ es un sustituyente unido a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R⁵, -alquenoil C₂₋₄-R⁵, -alquinilo C₂₋₄-R⁵, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo-R⁹ -cicloalquilo-R₆, -arilo-R⁶ y -(C₁₋₄)alquilo-N-R⁷; con la condición de que, cuando R₂ esté unido a un átomo de carbono, R₂ se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -alcoxi C₁₋₄-R⁵, -N-R⁷, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, oxo, -heterociclilo-R⁶ y -heteroarilo-R⁶.

20 En una divulgación, R² es un sustituyente unido a un átomo de carbono o nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R⁵ y -arilo-R⁶, con la condición de que, cuando R² esté unido a un átomo de nitrógeno, no se forma una sal cuaternaria; y, con la condición de que cuando R² esté unido a un átomo de carbono, R² se selecciona adicionalmente del grupo que consiste de -N-R⁷, halógeno, hidroxilo y -heteroarilo-R⁶.

25 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R³ es 1 a 3 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R¹⁰, -alquenoil C₂₋₄-R¹⁰, -alquinilo C₂₋₄-R¹⁰, -C₁₋₄alcoxi-R¹⁰, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -C(O)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₄-R⁹), -C(O)-N(alquilo C₁₋₄-R⁹)₂, -C(O)-cicloalquilo-R⁸, -C(O)-heterociclilo-R⁸, -C(O)-arilo-R⁸, -C(O)-heteroarilo-R⁸, -C(NH)-NH₂, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -C(O)-O-arilo-R⁸, -SO₂-(C₁₋₈)alquilo-R⁹, -SO₂-arilo-R⁸, -N-R⁷, -(C₁₋₄)alquilo-N-R⁷, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo-R⁸, -heterociclilo-R⁸, -arilo-R⁸ y -heteroarilo-R⁸.

30 En una divulgación, R³ es un sustituyente unido a un átomo de carbono seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R¹⁰, -alquenoil C₂₋₄-R¹⁰, -alquinilo C₂₋₄-R¹⁰, -C₁₋₄alcoxi-R¹⁰, -C(O)H, -CO₂H, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, ciano, halógeno, hidroxilo, y nitro.

35 En una divulgación R³ es un sustituyente unido a un átomo de carbono seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R¹⁰, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, halógeno e hidroxilo.

40 En el presente documentos se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R⁴ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R¹⁰, -alquenoil C₂₋₄-R¹⁰, -alquinilo C₂₋₄-R¹⁰, -alcoxi C₁₋₄-R¹⁰, -C(O)H, -C(O)-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -C(O)-NH₂, -C(O)-NH(alquilo C₁₋₄-R⁹), -C(O)-N(alquilo C₁₋₄-R⁹)₂, -C(O)-cicloalquilo-R⁸, -C(O)-heterociclilo-R⁸, -C(O)-arilo-R⁸, -C(O)-heteroarilo-R⁸, -C(NH)-NH₂, -CO₂H, -C(O)-O-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -C(O)-O-arilo-R⁸, -SH, -S-(C₁₋₄)alquilo-R¹⁰, -SO₂-(C₁₋₄)alquilo-R⁹, -SO₂-arilo-R⁸, -SO₂-NH₂, -SO₂-NH(alquilo C₁₋₄-R⁹), -SO₂-N(alquilo C₁₋₄-R⁹)₂, -N-R⁷, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo-R⁸, -heterociclilo-R⁸, -arilo-R⁸ y -heteroarilo-R⁸.

45 En una divulgación, R⁴ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R¹⁰, -alquenoil C₂₋₄-R¹⁰, -alquinilo C₂₋₄-R¹⁰, -alcoxi C₁₋₄-R¹⁰, -C(O)H, -CO₂H, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, -cicloalquilo, -heterociclilo, -arilo y -heteroarilo.

50 En una divulgación, R⁴ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R¹⁰, -alcoxi C₁₋₄-R¹⁰, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, halógeno e hidroxilo.

55 En una divulgación, R⁴ es 1 a 4 sustituyentes unidos a un átomo de carbono seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -alquilo C₁₋₄-R¹⁰, -alcoxi C₁₋₄-R¹⁰, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, cloro, flúor e hidroxilo.

60 En el presente documento se divulgan compuestos de Fórmula (II) en donde, R¹⁰ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, ciano, (halo)₁₋₃, hidroxilo, nitro y oxo.

65 En una divulgación, R¹⁰ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y, (halo)₁₋₃.

En una divulgación, R¹⁰ es 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y , (fluoro)₃.

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.

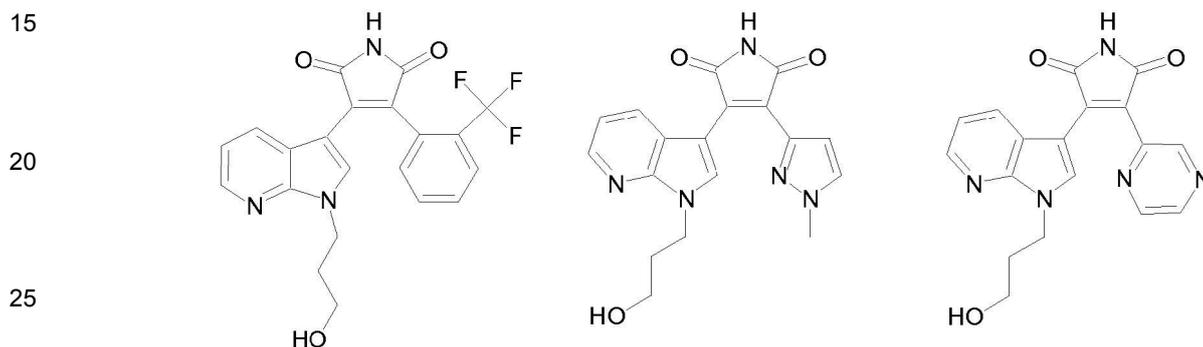
15 La divulgación del presente documento incluye un compuesto de Fórmula (II) en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:

Compuesto	Nombre
20	1. 3-(2-clorofenil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 2. 3-(2-clorofenil)-4-[1-[3-(dimetilamino)propil]-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 3. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1-naftalenil)-1H-pirrol-2,5-diona, 4. 3-[1-[3-(dimetilamino)propil]-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1-naftalenil)-1H-pirrol-2,5-diona, 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, 25 6. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1H-indazol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona, 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, 8. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona, 9. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(3-metoxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona, 30 10. 3-(2-cloro-4-fluorofenil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 11. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-pirrol-2,5-diona, 12. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(2-piridinil)-1H-pirrol-2,5-diona, 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, 35 14. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(2-tienil)-1H-pirrol-2,5-diona, 15. 3-(2,5-dicloro-3-tienil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 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, 17. 3-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(1H-imidazol-2-il)-1H-pirrol-2,5-diona, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 50 24. 4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-[3,3'-bi-1H-pirrol]-2,5-diona, 25. 3-(2-benzofuranil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 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, 27. 2,5-dihidro-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-carbonitrilo, 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, 55 29. 3-(4-dibenzofuranil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 30. 3-(2-hidroxiifenil)-4-[1-(3-metoxipropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 31. 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-[1-(3-metoxipropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 32. 3-(3,4-dihidroxiifenil)-4-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 33. 3-(2-metoxifenil)-4-[1-(2-naftalenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona, 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, 35. 3-[1-(3-aminopropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona, 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, 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.

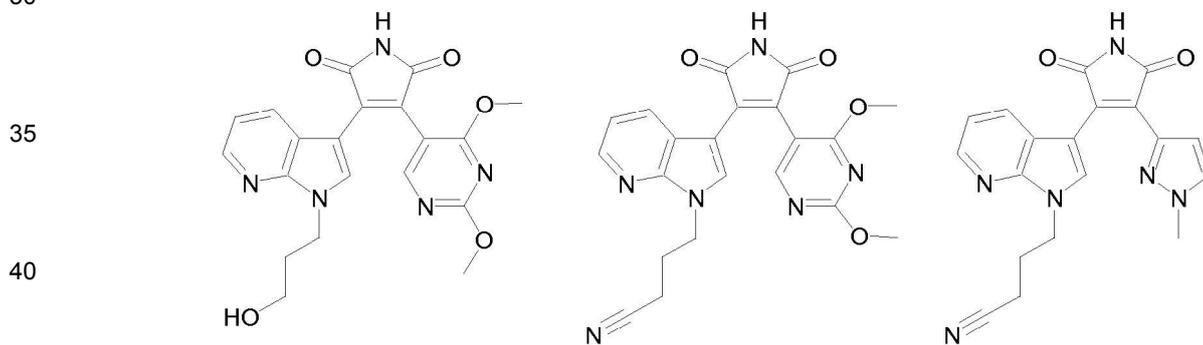
En el presente documento se divulga un compuesto de Fórmula (II) en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de :



Compuesto 11

Compuesto 26

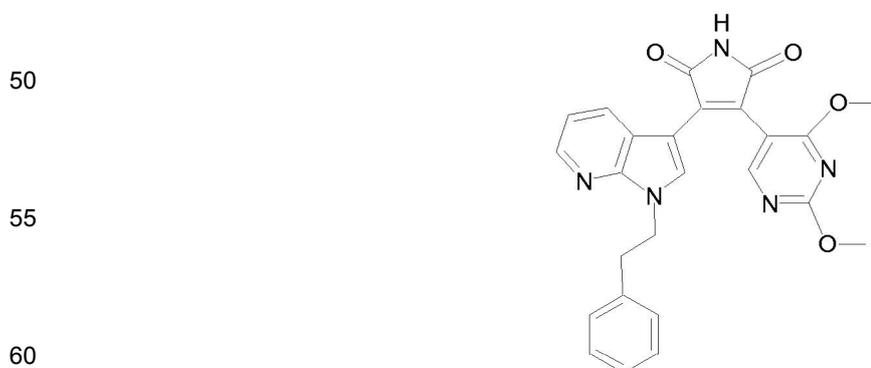
Compuesto 40



Compuesto 41

Compuesto 42

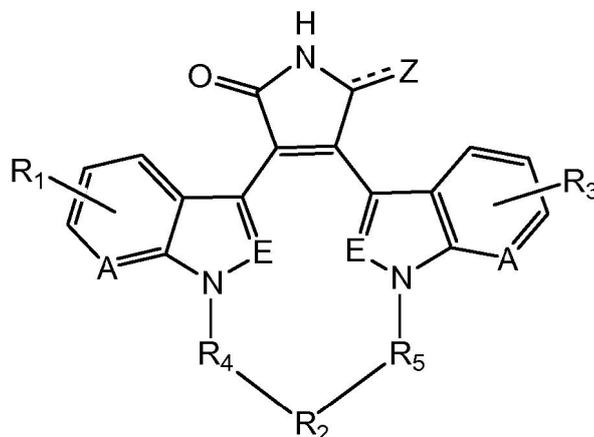
Compuesto 43



Compuesto 44

65

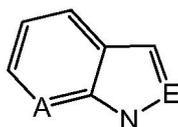
En una realización, el inhibidor de la actividad de la enzima GSK-3B es un compuesto de Fórmula (III):



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;

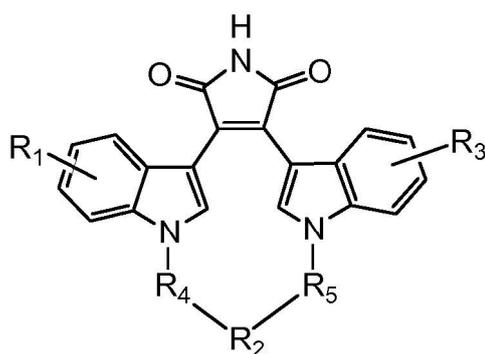
R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de alquilo C₁₋₈, alquenilo C₂₋₈ y alquinilo C₂₋₈ opcionalmente sustituidos con oxo;

R₂ se selecciona del grupo que consiste de -alquilo C₁₋₈, -alquenilo C₁₋₈, -alquinilo C₁₋₈, -O-(C₁₋₈)alquilo-O-, -O-(C₂₋₈)alquenil-O-, -O-(C₂₋₈)alquinil-O-, -C(O)-(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, -C(O)O-(C₁₋₈)alquilo, -alquilo C₁₋₈--C(O)O-(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxil, hidroxil(C₁₋₈)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(C₁₋₈)alquilo, arilo(C₁₋₈)alquilo, heteroarilo(C₁₋₈)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 C₁₋₅, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈ (C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxilo(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxil e hidroxil(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente

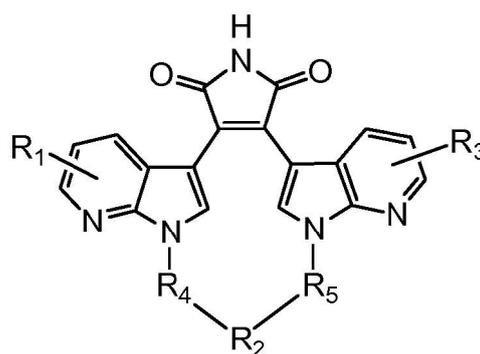
de heterociclilo, arilo y heteroarilo precedentes ests sustituidos opcionalmente con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxil e hidroxil(C₁₋₈)alquilo; y, en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con oxo)); y,

R₁ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₈, alquenilo C₂₋₈, alquinilo C₂₋₈ (en donde el alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de alcoxi C₁₋₈, alcoxi(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), (halo)₁₋₃, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxil, hidroxil(C₁₋₈)alquilo y oxo), alcoxi C₁₋₈, alcoxycarbonilo C₁₋₈, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, alquiltio C₁₋₈, arilo, heteroarilo (en donde el arilo y el heteroarilo están opcionalmente sustituidos con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de alquilo C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxil e hidroxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), ciano, halógeno, hidroxil y nitro; y sales farmacticamente aceptables de los mismos.

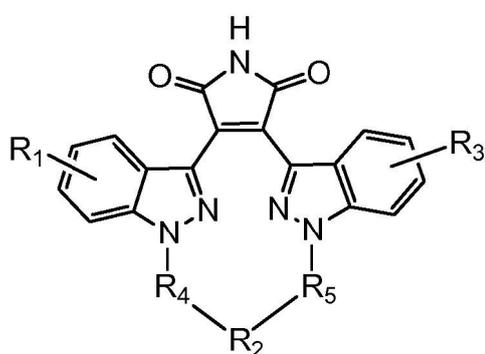
En una realización, un compuesto de fórmula (III) es un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



Formula (IIIa)



Formula (IIIb)

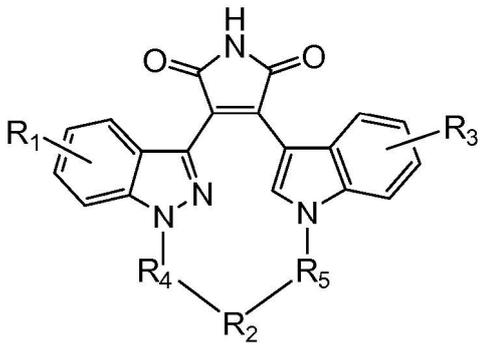


Formula (IIIc)

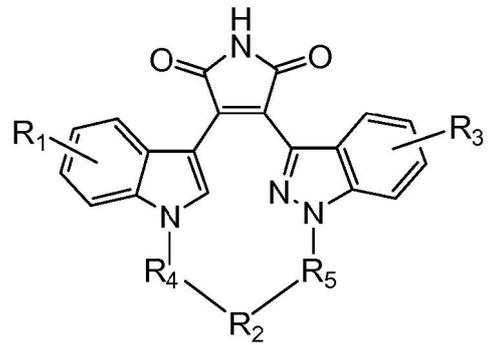


Formula (IIIId)

5



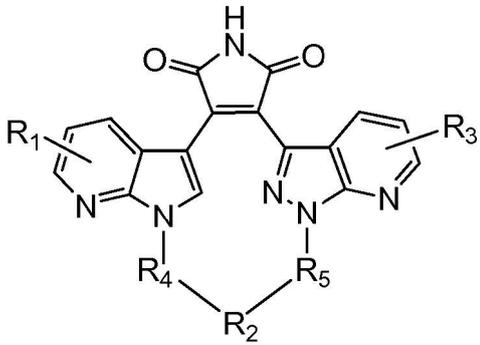
Formula (IIIe)



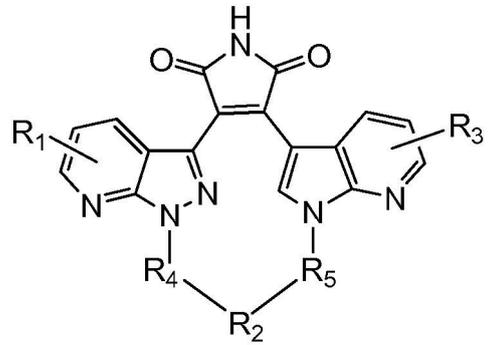
Formula (IIIf)

10

15



Formula (IIIg)

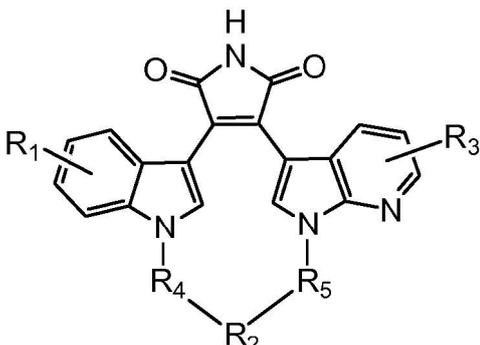


Formula (IIIh)

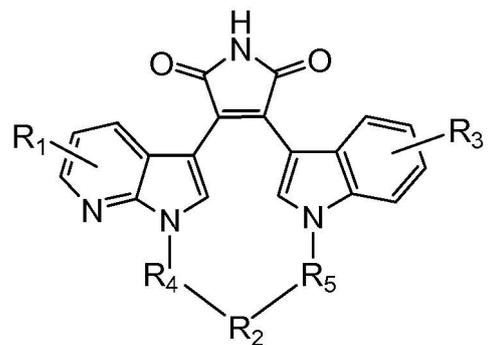
20

25

30



Formula (IIIi)



Formula (IIIj)

35

40

45

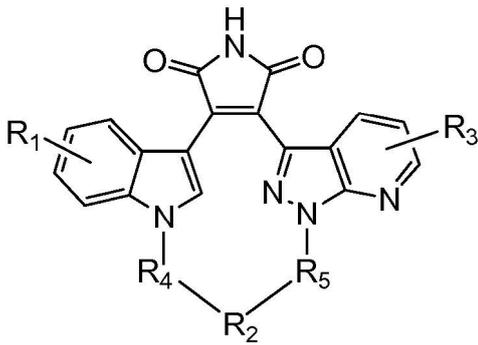
50

55

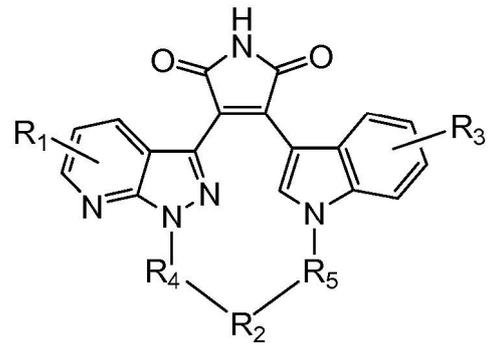
60

65

5



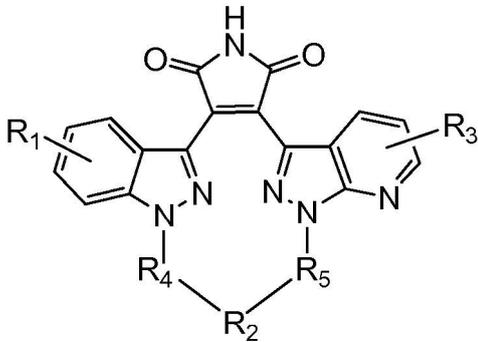
Formula (IIIk)



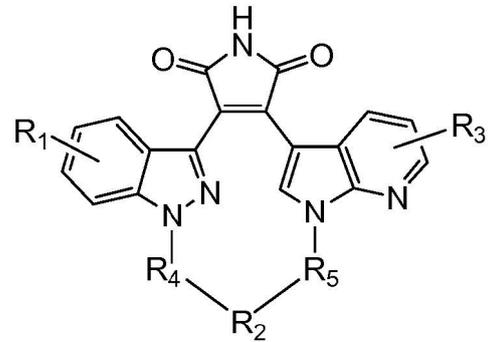
Formula (IIIi)

10

15



Formula (IIIm)



Formula (IIIn)

20

25

30

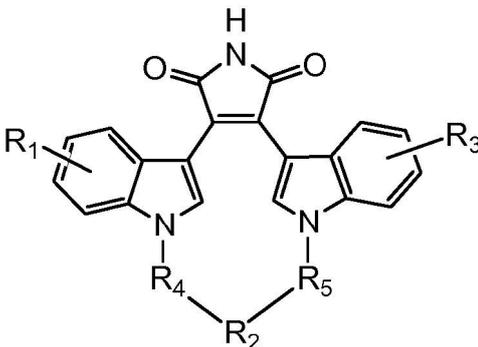
35

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

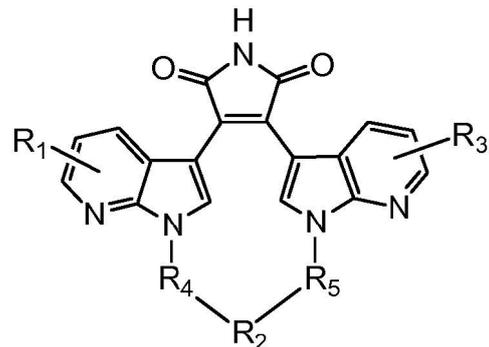
40

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

45



Formula (IIIa)



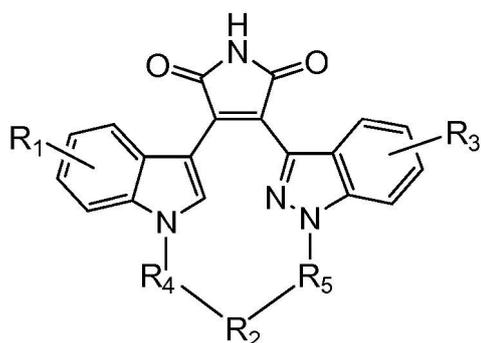
Formula (IIIb)

50

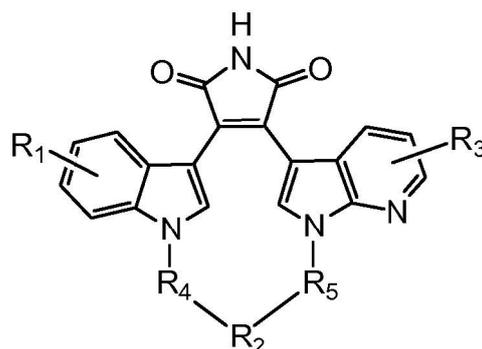
55

60

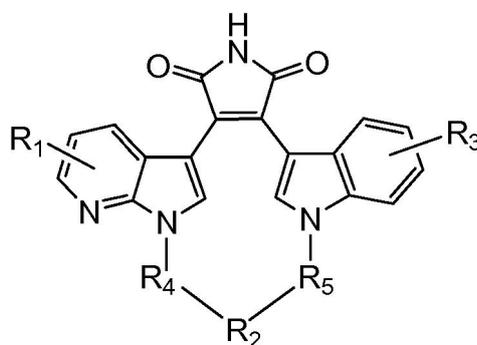
65



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.

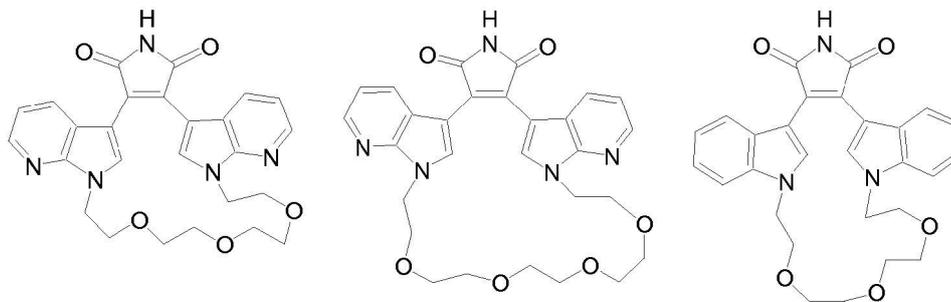
Los compuestos de Fórmula (III) se divulgan en la Patente de Estados Unidos de titularidad compartida N° 6.828.327, la divulgación completa de la cual se incorpora en la presente por referencia.

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-k:3',2'-q]pirrolo[3,4-n][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-n:3',2'-f]pirrolo [3,4-q][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-q:3',2'-w]pirrolo[3,4-f][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[h,n]pirrolo[3,4-k][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[k,q]pirrolo[3,4-n][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[n,t]pirrolo[3,4-q][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[q,w]pirrolo [3,4-f][1,4,7,10,13,16,25]pentaoxadiazacicloheptacosina-1,3(2H)-diona,
8.	12-hidro-6H,19H-5,22:13,18:7,11-trimeteno-pirido[2,3-j]pirrolo[3,4-m][1,9]benzodiazacicloheptadecine-19,21(20H)-diona,
9.	12-hidro-6H,19H-5,22:13,18-dimeteno-7,11-nitrilopirido[2,3-j]pirrolo[3,4-m][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-dimeteno-dibenzo[*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-dimeteno-dipirido[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-dimeteno-dipirido[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-dimeteno-dipirido[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-dimeteno-dipirido[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.

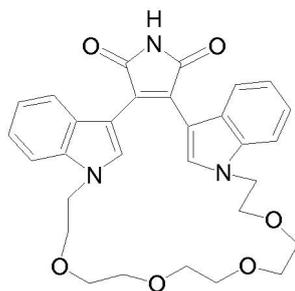
Un ejemplo de la invención incluye un compuesto de Fórmula (III) en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de:



Compuesto 1

Compuesto 2

Compuesto 5



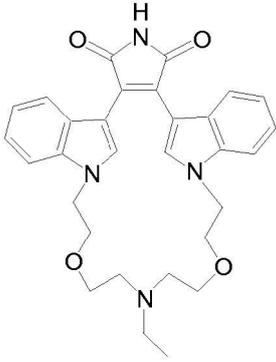
Compuesto 6

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

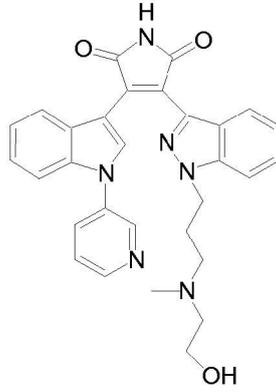
Compuesto	Nombre
1a	A ser proporcionado
2a	3-[1-[3-[(2-hidroxi-etil)metilamino]propil]-1H-indazol-3-il]-4-[1-(3-piridinil)-1H-indol-3-il]-1H-pirrol-2,5-diona,
3a	3,5-dicloro-N-[3-cloro-4-[(3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]tiazino[3,4-c][1,4]benzodiazepin-11-il)carbonil]fenil]-benzamide,
5a	3-(2-metoxi-fenil)-4-(1-piridin-3-il-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona,
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]fluoruro-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-[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.

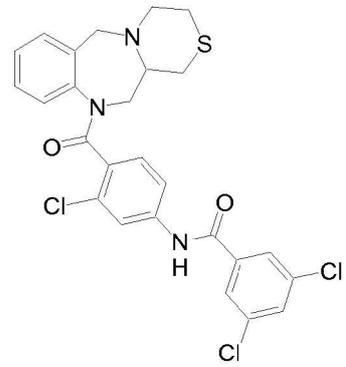
5 Otros ejemplos de la invención incluyen un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



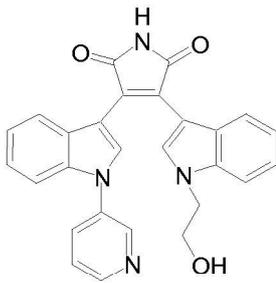
Compuesto 1a



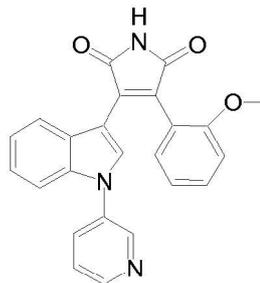
Compuesto 2a



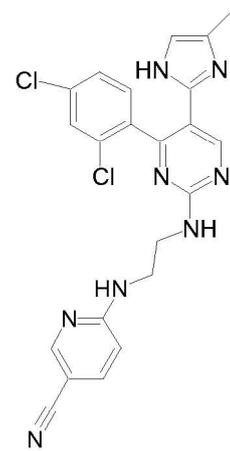
Compuesto 3a



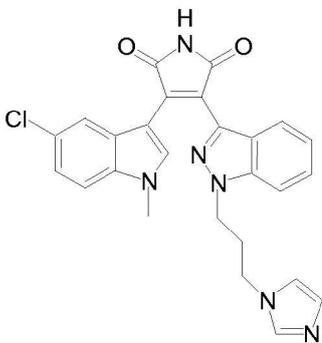
Compuesto 4a



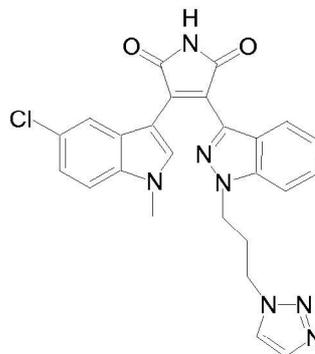
Compuesto 5a



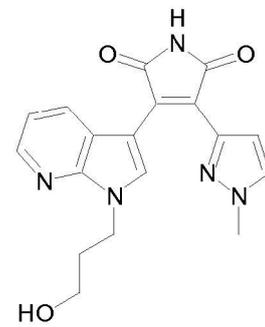
Compuesto 6a



Compuesto 7a

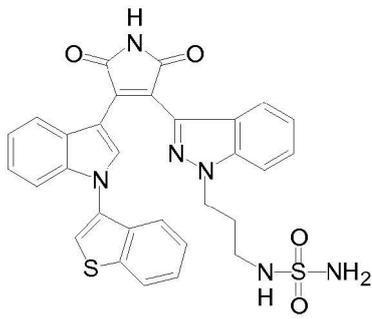


Compuesto 8a

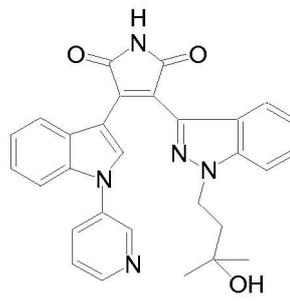


Compuesto 9a

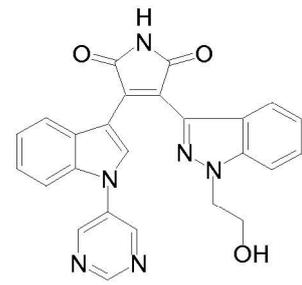
5



Compuesto 10a

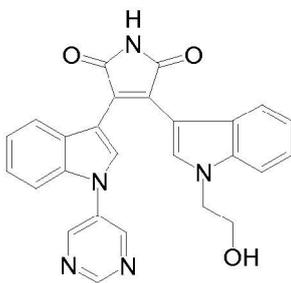


Compuesto 11a

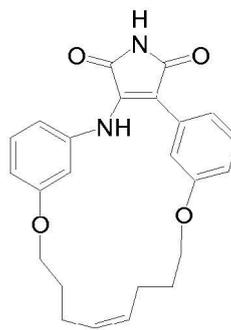


Compuesto 12a

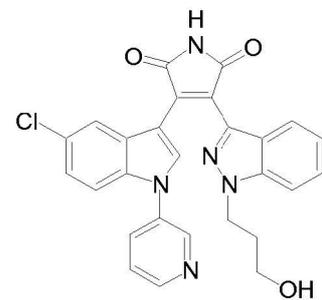
15



Compuesto 13a



Compuesto 14a



Compuesto 15a

20

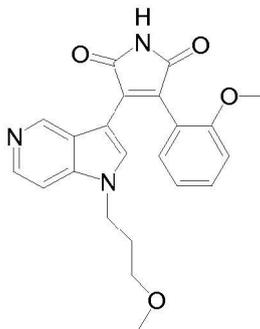
25

30

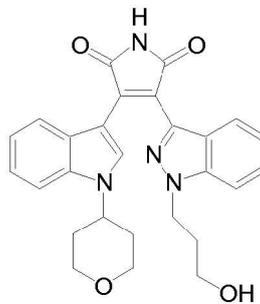
35

40

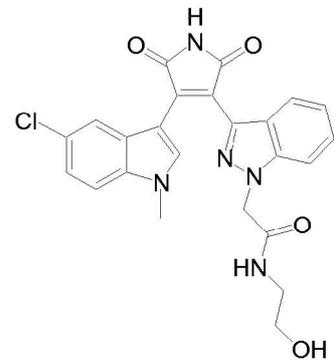
45



Compuesto 16a



Compuesto 17a

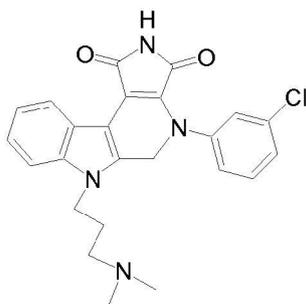


Compuesto 18a

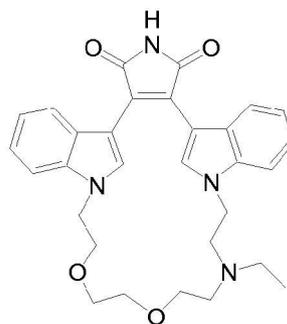
50

55

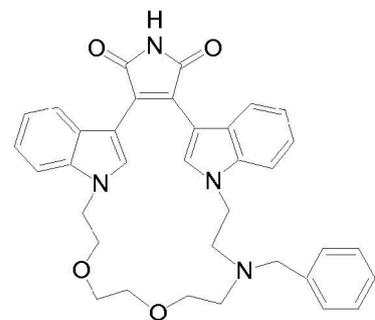
60



Compuesto 19a



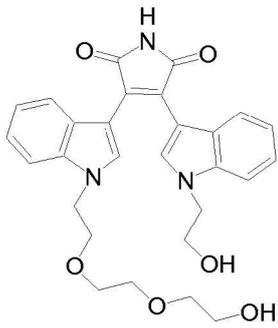
Compuesto 20a



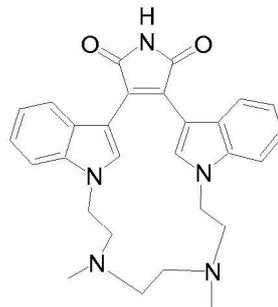
Compuesto 21a

65

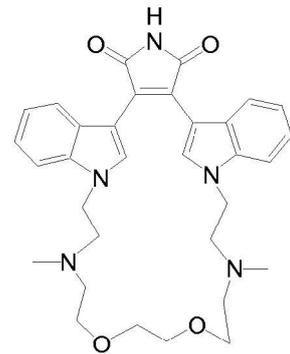
5



Compuesto 22a



Compuesto 23a



Compuesto 24a

10

15

20

25

30

35

40

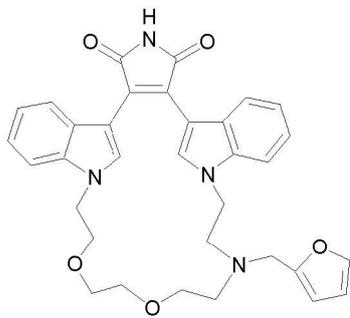
45

50

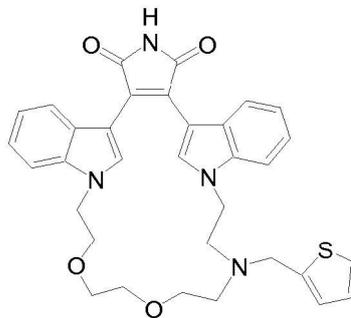
55

60

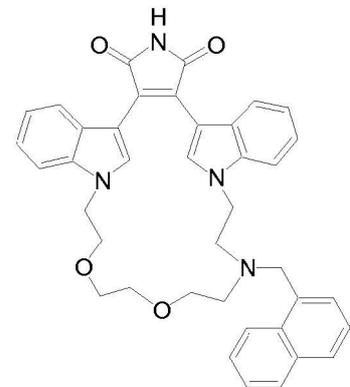
65



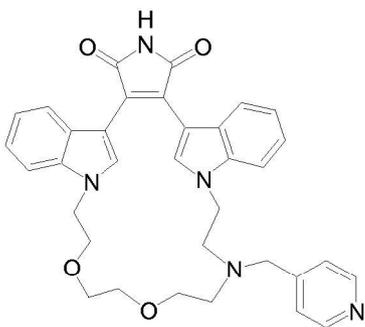
Compuesto 25a



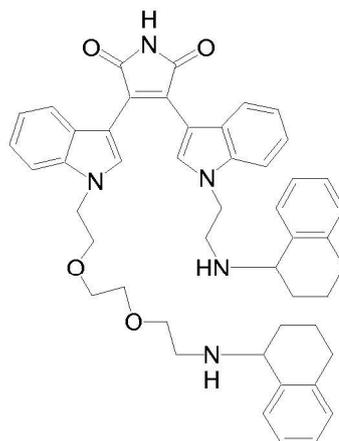
Compuesto 26a



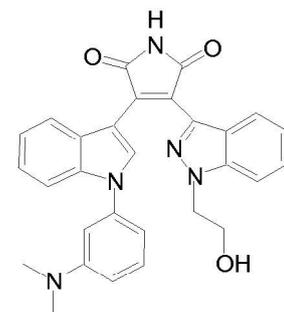
Compuesto 27a



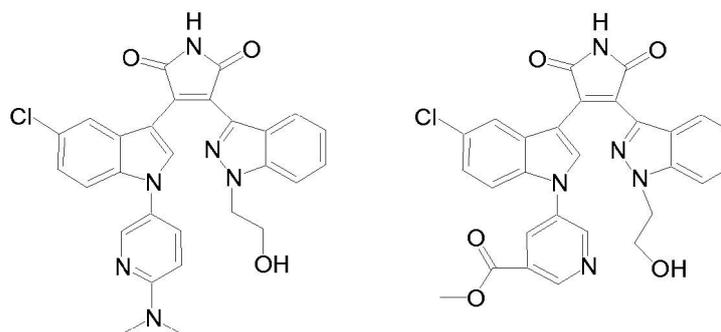
Compuesto 28a



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 embriionario 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% O₂ a aproximadamente 20% O₂. En una forma de realización alternativa, la condición hipóxica es de aproximadamente 2% O₂ a aproximadamente 10% O₂. En una forma de realización alternativa, la condición hipóxica es de aproximadamente 3% O₂.

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 ml de 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 β . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β 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 β es una célula β .

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

25 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

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 β son bien conocidos para los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje de células β 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 β . Características específicas de linaje de células β 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 β .

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 2×10^4 /cm² 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% CO₂/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% O₂).

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% O₂) 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/cm² 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% O₂) 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/cm² 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% O₂) 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/cm² 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% O₂) 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/cm² en matraces de poliestireno Falcon y se cultivaron en cultivo en monocapa a 37°C, 5% de CO₂. 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 μ 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 β 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 μ 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 CO₂ 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 μ 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 μ 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 dicróico 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 CO₂ 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 β 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 μ 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 CO₂ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 β 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 β 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 CO₂ 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 μ M y 5 μ 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 10⁵ 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_k 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 (Δ 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 CO₂ 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 transcrito 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 (Δ 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 β . 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 β 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 β 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 μ 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 μ 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 μ M KAAD ciclopamina, 2 μ 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 μ 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 μ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100 μ 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 (ΔC_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 μ 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 μ M KAAD de ciclopamina, 2 μ 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 μ M DAPT (inhibidor de secretasa gamma: EMD Biosciences) y 50 ng/ml de exendina 4 (Sigma-Aldrich) y 1 μ M TGFbeta R1 inhibidor II (inhibidor ALKS; EMD Biosciences). Durante este período de seis días, los inhibidores de GSK3 β 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 μ 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 μ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100 μ 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 β 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

Anticuerpo conjugado secundario	Proveedor	Dilución
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 (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
25	JNJ24843585	0.652	0.624	0.638	0.01916	3.00	78.5
	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
45	JNJ26483249	0.697	0.695	0.696	0.00113	0.16	87.3
	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
35	RWJ674320	0.456	0.474	0.465	0.01223	2.63	50.8
	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
	AA solo		0.8732 0.9046	0.8889	0.0222	2.5	106.0
65	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
RWJ673681	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
RWJ673681	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
RWJ673681	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
RWJ553709	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
A.A	147	0.08138889	20330009	0.1168	8	0.00014569	87206	0.0006
A.A/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
Medio acondicionado	1.1348	1.0099	1.1092	1.0846	0.0660	6.1	116.5
No tratamiento	0.9344	0.5977	0.8454	0.7925	0.1745	22.0	85.2
AA/DMSO	0.3878	0.2434	0.2252	0.2855	0.0891	31.2	30.7
AA/Wnt3a/DMSO	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
Medio acondicionado	1.1525	1.1269	1.1140	1.1311	0.0196	1.7	71.0
No tratamiento	1.2057	1.2358	1.3132	1.2516	0.0555	4.4	78.6
AA/DMSO	0.2622	0.2073	0.2830	0.2508	0.0391	15.6	15.8
AA/Wnt3a/DMSO	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
	Nombre JNJ	Datos en bruto			Promedio	S.D.	% CV	% Control
	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
	RWJ674856	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
	Nombre JNJ	Datos en bruto		Promedio	S.D.	% CV	% Control
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

	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
5	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
	Nombre JNJ	Datos en bruto	Promedio	S.D.	% CV	% Control
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
	Nombre JNJ	Datos en bruto	Promedio	S.D.	% CV	% Control
	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
Nombre JNJ	Datos en bruto	Promedio	S.D.	% CV	% Control
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
Nombre JNJ	Datos en bruto	Promedio	S.D.	% CV	% Control
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	
[μ M]	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	
[μ M]	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	
[μ M]	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	
[μ M]	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	
[uM]	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	
[uM]	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	
[uM]	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	
[uM]	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								
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								
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								
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								
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

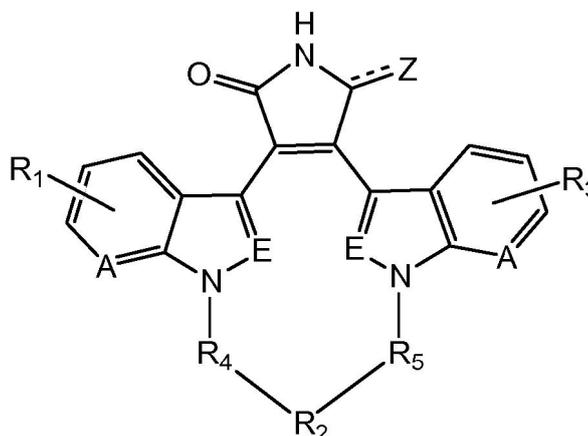
Tabla XI: Efectos DEPENDIENTES de la dosis de los inhibidores de la actividad enzimática GSK-3B en la DIFERENCIACIÓN de las CÉLULAS de la línea de células madre embrionarias humanas H9.

Concentración _i	JNJ10220067		JNJ17163796		JNJ17189731		JNJ17223375		JNJ18157698	
[μ M]	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 _i	JNJ26158015		JNJ26483197		JNJ26483249		JNJ17225871		JNJ17228458	
[μ M]	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 _i	JNJ19370026		JNJ26150202		JNJ26170833		JNJ26177086		JNJ26177762	
[μ M]	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 _i	JNJ26512005		JNJ26533065		JNJ26533156		JNJ26174194		JNJ3026582	
[μ M]	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:

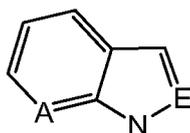
- 30 a) Células madre embrionarias; o
 b) Células que expresan marcadores de pluripotencia, derivadas de células madre embrionarias, en donde preferiblemente, las células que expresan marcadores de pluripotencia expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores de pluripotencia seleccionados del 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 R4 y R5 se seleccionan independientemente de alquilo C1-8, alqueno C2-8 y alquino C2-8 opcionalmente sustituido con oxo.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde R₂ se selecciona del grupo que consiste de -alquilo C₁₋₈, -alqueno C₁₋₈, -alquino C₁₋₈, -O-(C₁₋₈)alquilo-O-, -O-(C₂₋₈)alqueno-O-, -O-(C₂₋₈)alquino-O-, -C(O)-(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, -C(O)O-(C₁₋₈)alquilo, -alquilo C₁₋₈-C(O)O-(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxilo, hidroxil(C₁₋₈)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(C₁₋₈)alquilo, arilo(C₁₋₈)alquilo, heteroarilo(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C₁₋₈)alquilo; y en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con oxo), -(O-(CH₂)₁₋₆)₀₋₅-O-, -O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-O-, -O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-O-, -(O-(CH₂)₁₋₆)₀₋₅-NR₆-, -O-(CH₂)₁₋₆-NR₆-(CH₂)₁₋₆-O-, -O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-NR₆-, -(O-(CH₂)₁₋₆)₀₋₅-S-, -O-(CH₂)₁₋₆-S-(CH₂)₁₋₆-O-, -O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-S-, -NR₆-, -NR₆-NR₇-, -NR₆-(CH₂)₁₋₆-NR₇-, -NR₆-(CH₂)₁₋₆-NR₇-(CH₂)₁₋₆-NR₈-, -NR₆-C(O)-, -C(O)-NR₆-, -C(O)-(CH₂)₀₋₆-NR₆-(CH₂)₀₋₆-C(O)-, -NR₆-(CH₂)₀₋₆-C(O)-(CH₂)₁₋₆-C(O)-(CH₂)₀₋₆-NR₇-, -NR₆-C(O)-NR₇-, -NR₆-C(NR₇)-NR₈-, -O-(CH₂)₁₋₆-NR₆-(CH₂)₁₋₆-S-, -S-(CH₂)₁₋₆-NR₆-(CH₂)₁₋₆-O-, -S-(CH₂)₁₋₆-NR₆-(CH₂)₁₋₆-S-, -NR₆-(CH₂)₁₋₆-S-(CH₂)₁₋₆-NR₇- y -SO₂- (en donde R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), hidroxil(C₁₋₈)alquilo, heterociclil(C₁₋₈)alquilo, arilo(C₁₋₈)alquilo y heteroarilo(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C₁₋₈)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 R₂ se selecciona del grupo que consiste de -alquino C₂₋₈, -O-(C₁₋₈)alquil-O-, -O-(C₂₋₈)alqueno-O-, -O-(C₂₋₈)alquino-O-, -C(O)-(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, -C(O)O-(C₁₋₈)alquilo, -alquilo C₁₋₈-C(O)O-(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxilo, hidroxil(C₁₋₈)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(C₁₋₈)alquilo, arilo(C₁₋₈)alquilo, heteroarilo(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxilo e hidroxil(C₁₋₈)alquilo -O-(CH₂)₁₋₆)₁₋₅-O-, -O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-O-, -O-

(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-O-, -O-(CH₂)₁₋₆-1-5-NR₆-, -O-(CH₂)₁₋₆-NR₆-(CH₂)₁₋₆-O-, -O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-NR₆-, -O-(CH₂)₁₋₆-O-5-S-, -O-(CH₂)₁₋₆-S-(CH₂)₁₋₆-O-, -O-(CH₂)₁₋₆-O-(CH₂)₁₋₆-S-, -NR₆-NR₇-, -NR₆-(CH₂)₁₋₆-NR₇-, -NR₆-(CH₂)₁₋₆-NR₇-(CH₂)₁₋₆-NR₈-, -NR₉-C(O)-, -C(O)-NR₉-, -C(O)-(CH₂)₀₋₆-NR₆-(CH₂)₀₋₆-C(O)-, -NR₆-(CH₂)₀₋₆-C(O)-(CH₂)₁₋₆-C(O)-(CH₂)₀₋₆-NR₇-, -NR₆-C(O)-NR₇-, -NR₆-C(NR₇)-NR₈-, -O-(CH₂)₁₋₆-NR₆-(CH₂)₁₋₆-S-, -S-(CH₂)₁₋₆-NR₆-(CH₂)₁₋₆-O-, -S-(CH₂)₁₋₆-NR₆-(CH₂)₁₋₆-S- y -NR₆-(CH₂)₁₋₆-S-(CH₂)₁₋₆-NR₇- (en donde R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), hidroxil(C₁₋₈)alquilo, heterocicli(C₁₋₈)alquilo, aril(C₁₋₈)alquilo y heteroaril(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo consistente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C₁₋₈)alquilo; y, en donde el heterocicilo está opcionalmente sustituido con oxo); y, en donde R₉ se selecciona del grupo que consiste de alquilo C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), hidroxil(C₁₋₈)alquilo, heterocicli(C₁₋₈)alquilo, aril(C₁₋₈)alquilo y heteroaril(C₁₋₈)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 C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C₁₋₈)alquilo; y, en donde el heterocicilo está opcionalmente sustituido con oxo)).

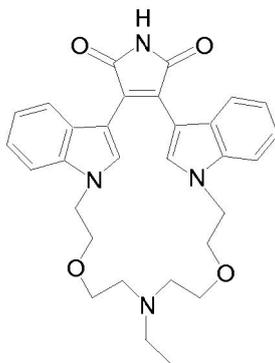
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde R₁ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo C₁₋₈, alqueno C₂₋₈, alquino C₂₋₈ (en donde el alquilo, alqueno y alquino están opcionalmente sustituidos con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de alcoxi C₁₋₈, alcoxi(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), (halo)₁₋₃, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxi, hidroxi(C₁₋₈)alquilo y oxo), alcoxi C₁₋₈, alcoxycarbonilo C₁₋₈, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, alquilo C₁₋₈, arilo, heteroarilo (en donde el arilo y el heteroarilo están opcionalmente sustituidos con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de alquilo C₁₋₈, alcoxi C₁₋₈, alcoxi(C₁₋₈)alquilo, carboxilo, carboxil(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), amino(C₁₋₈)alquilo (en donde el amino está sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), halógeno, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alquilo, (halo)₁₋₃(C₁₋₈)alcoxi, hidroxi e hidroxi(C₁₋₈)alquilo, amino (sustituido con un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo C₁₋₄), 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-indazo[1,3-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

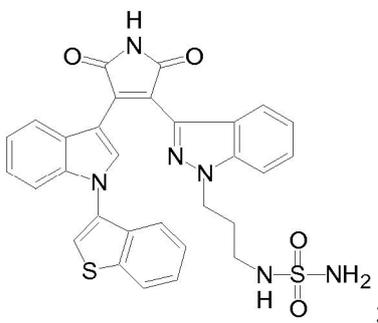


10

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

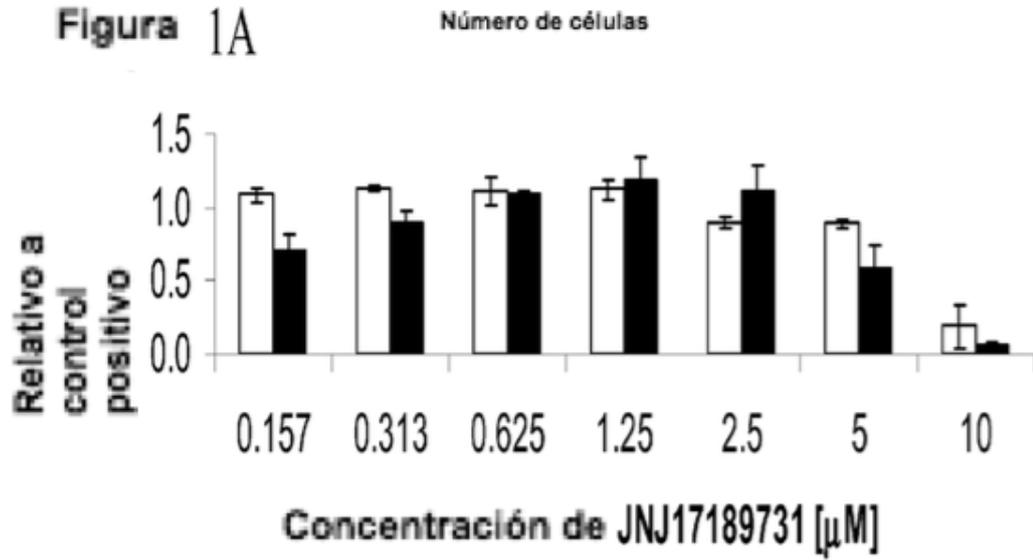


Figura 1B

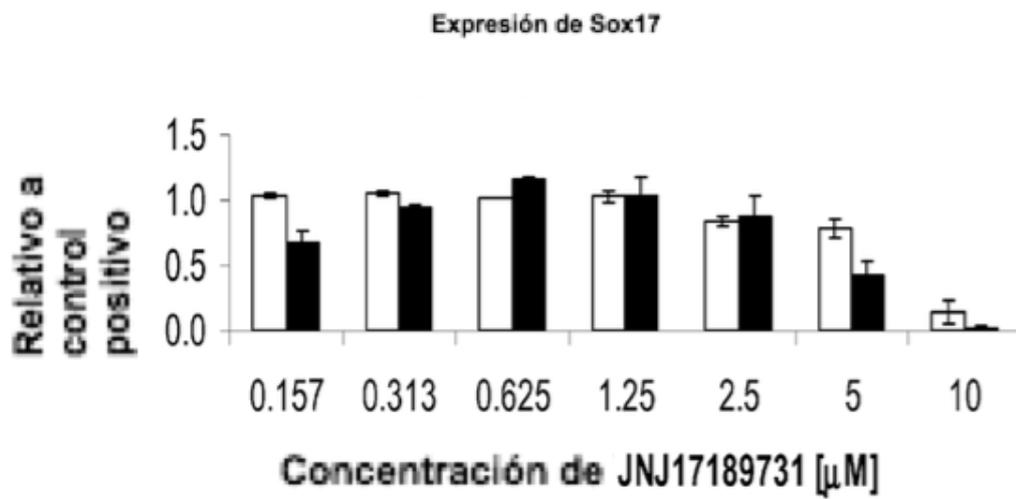


Figura 2A

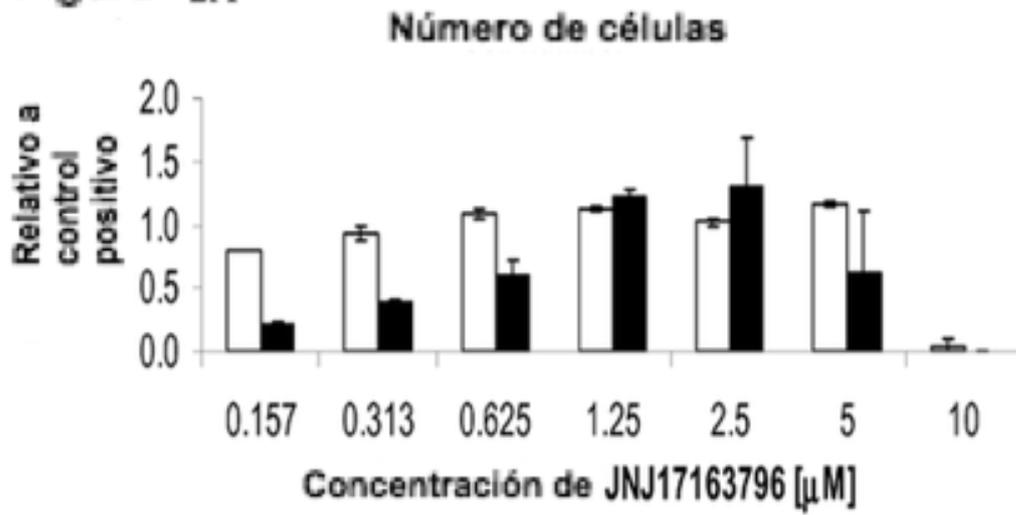


Figura 2B

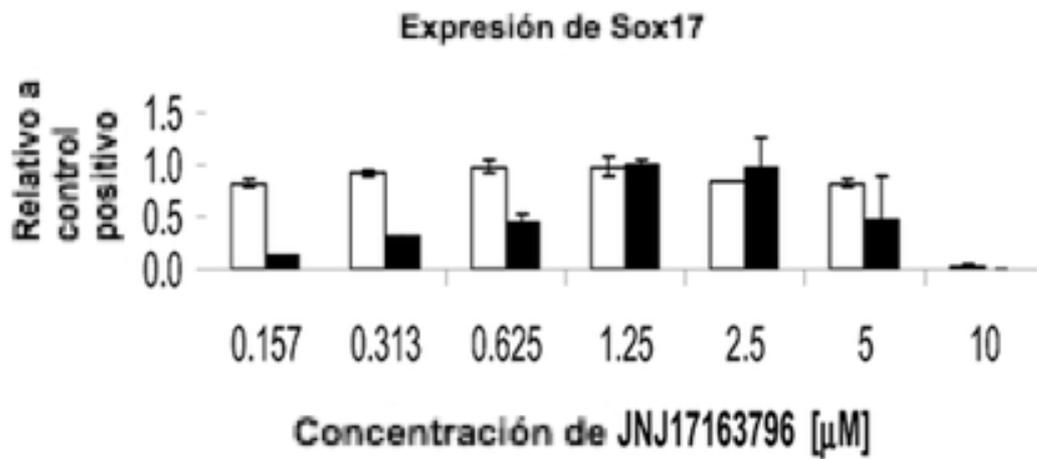


Figura 3A

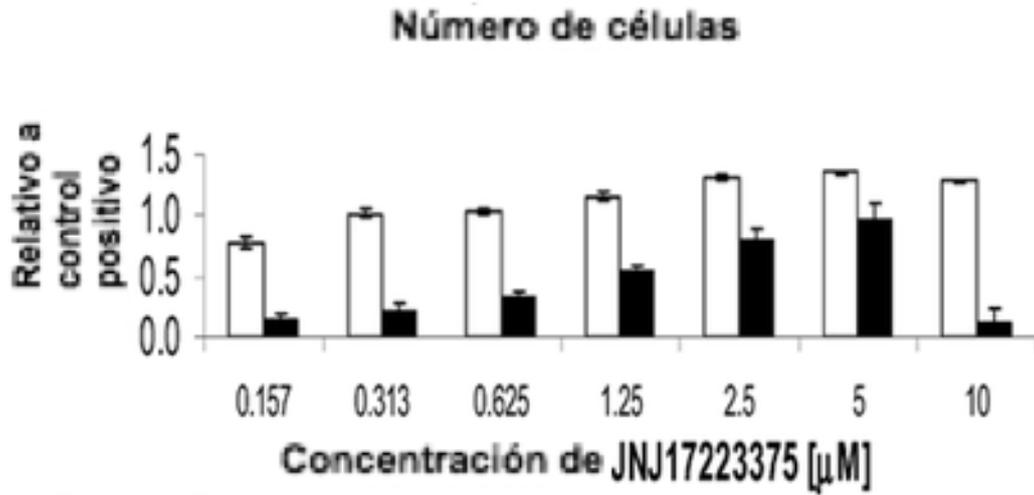


Figura 3B

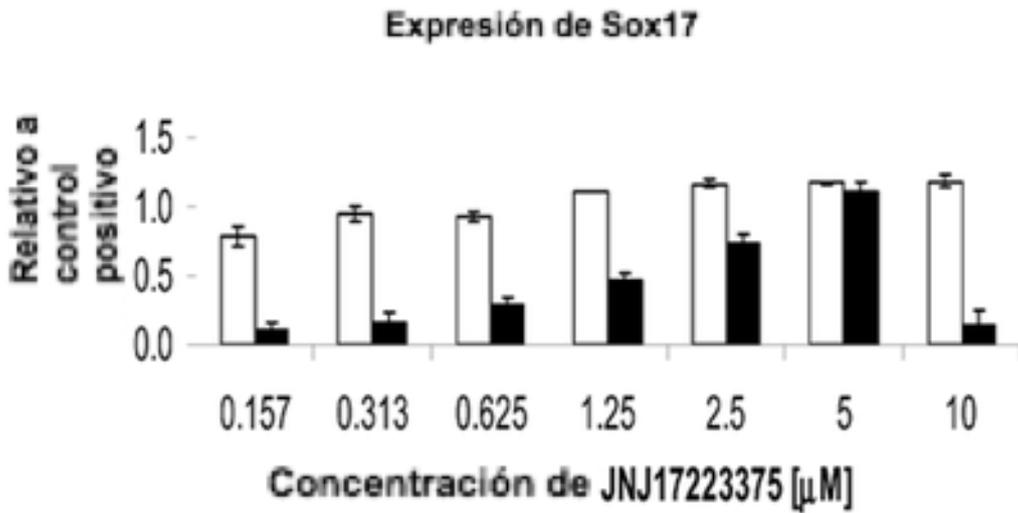


Figura 4A

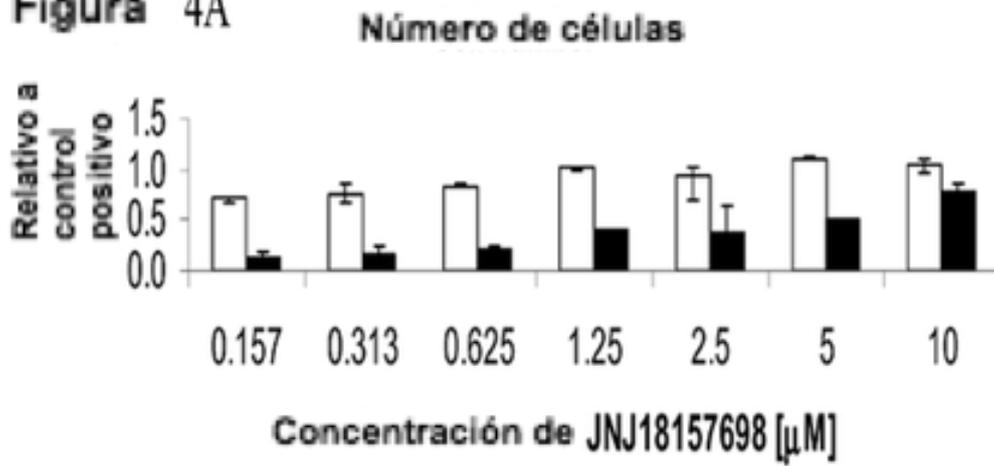


Figura 4B

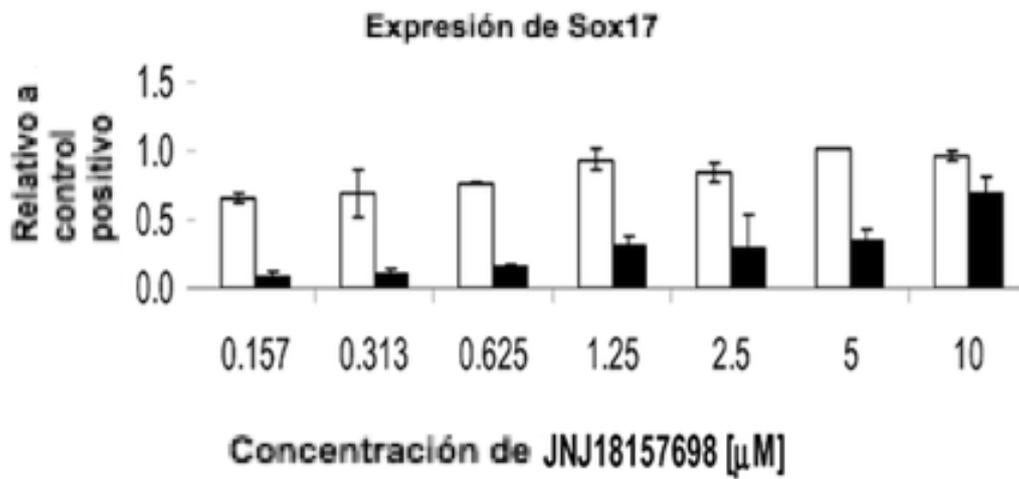


Figura 5A

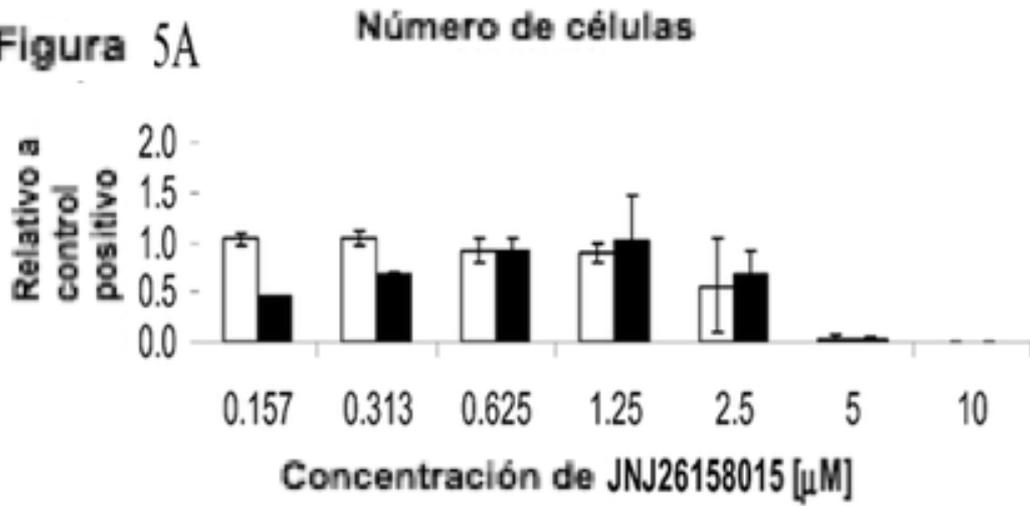


Figura 5B

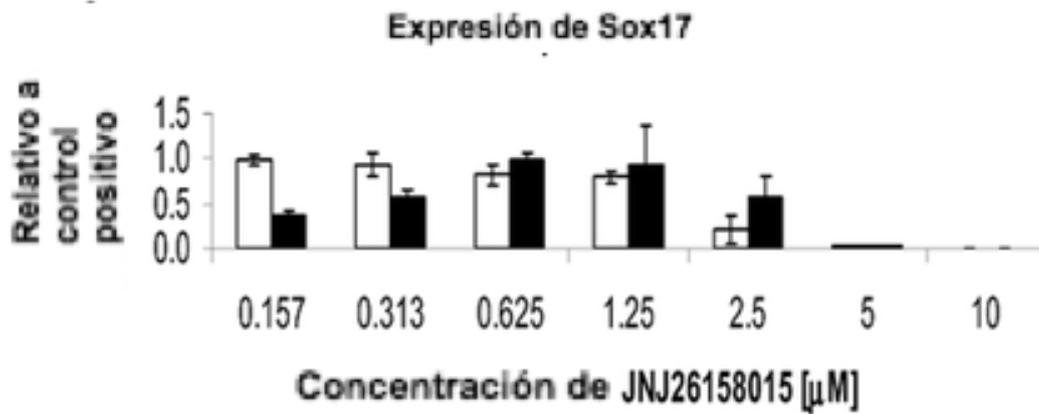


Figura 6A

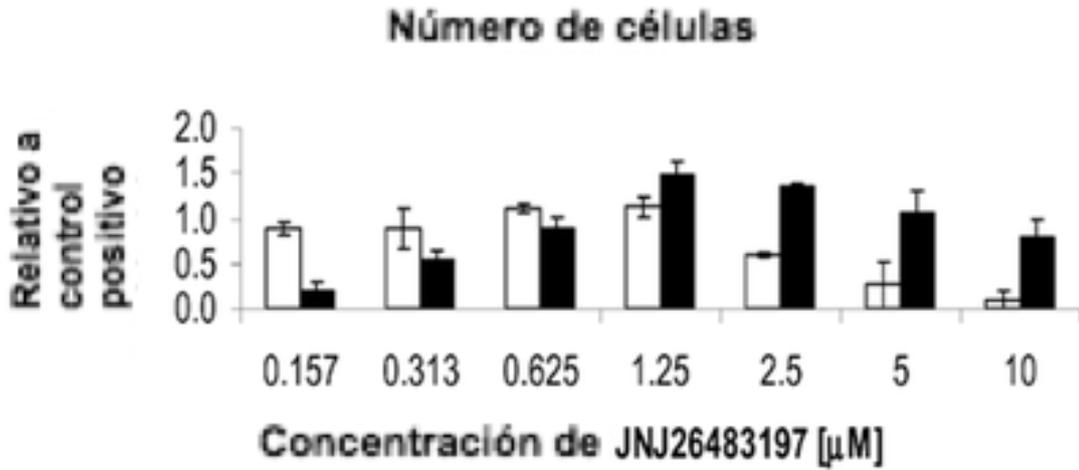


Figura 6B

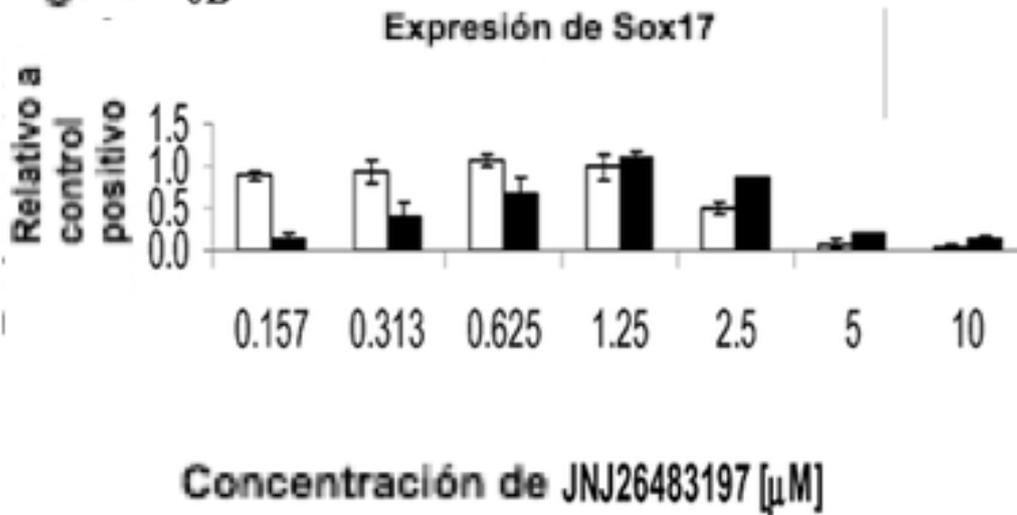


Figura 7A

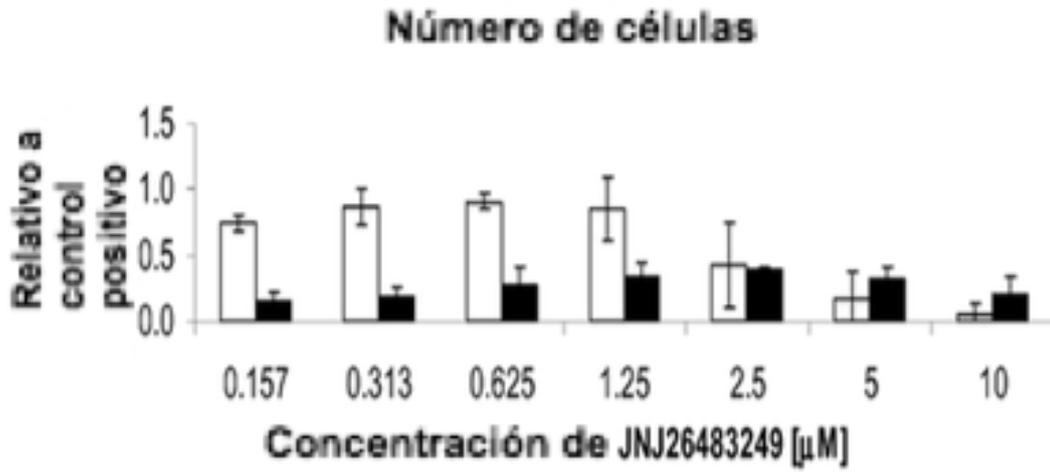


Figura 7B

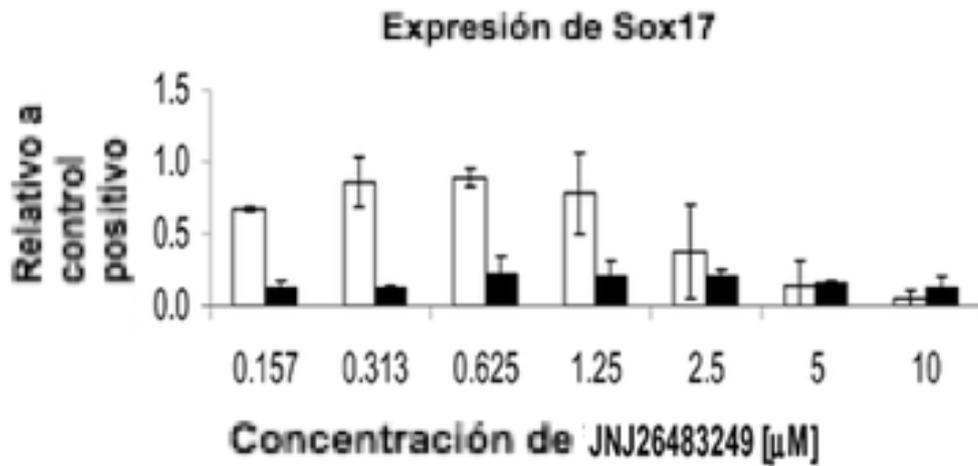


Figura 8A

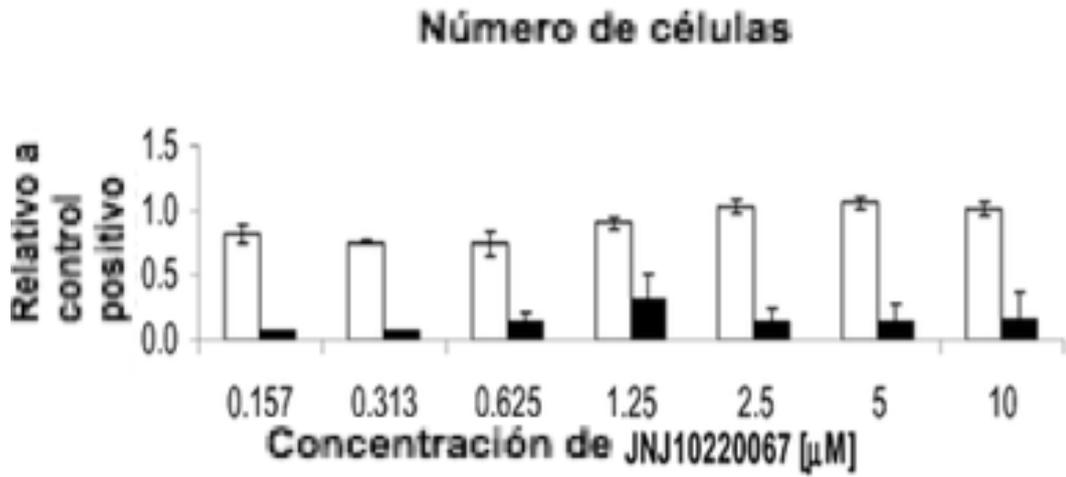


Figura 8B

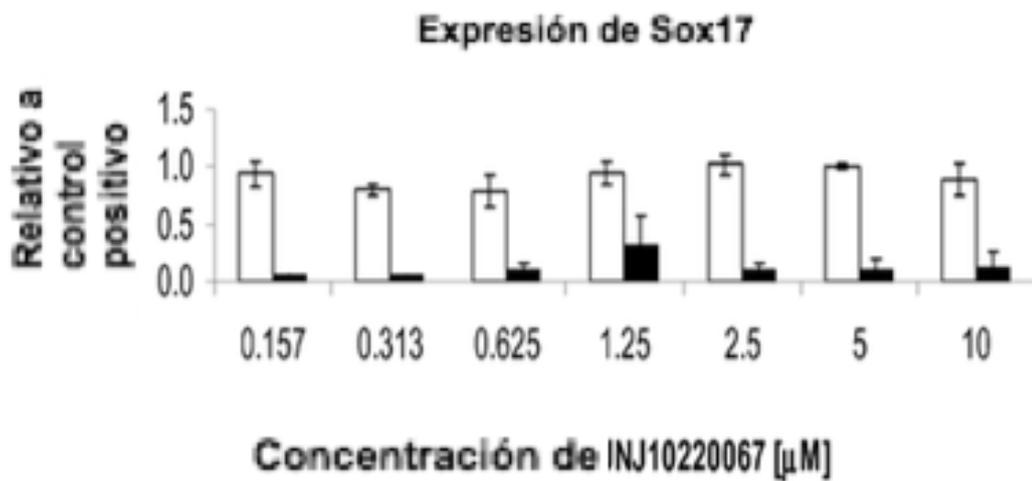


Figura 9

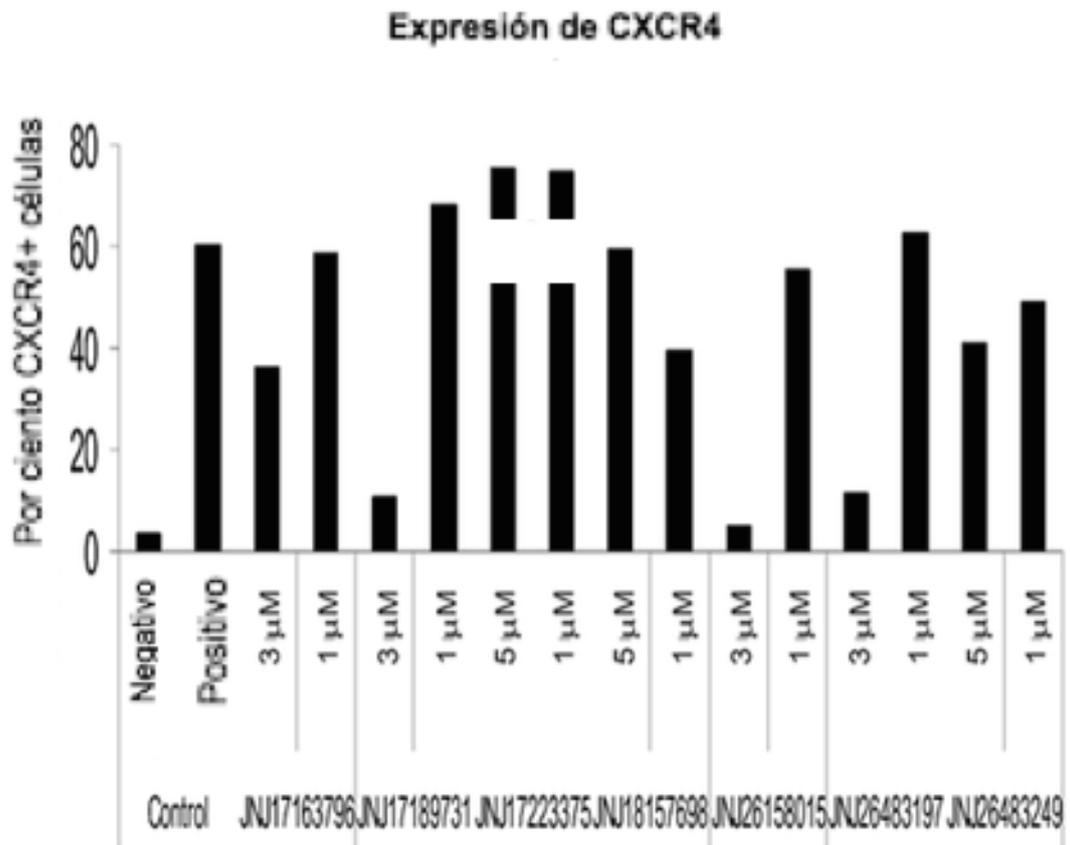


Figura 10-A

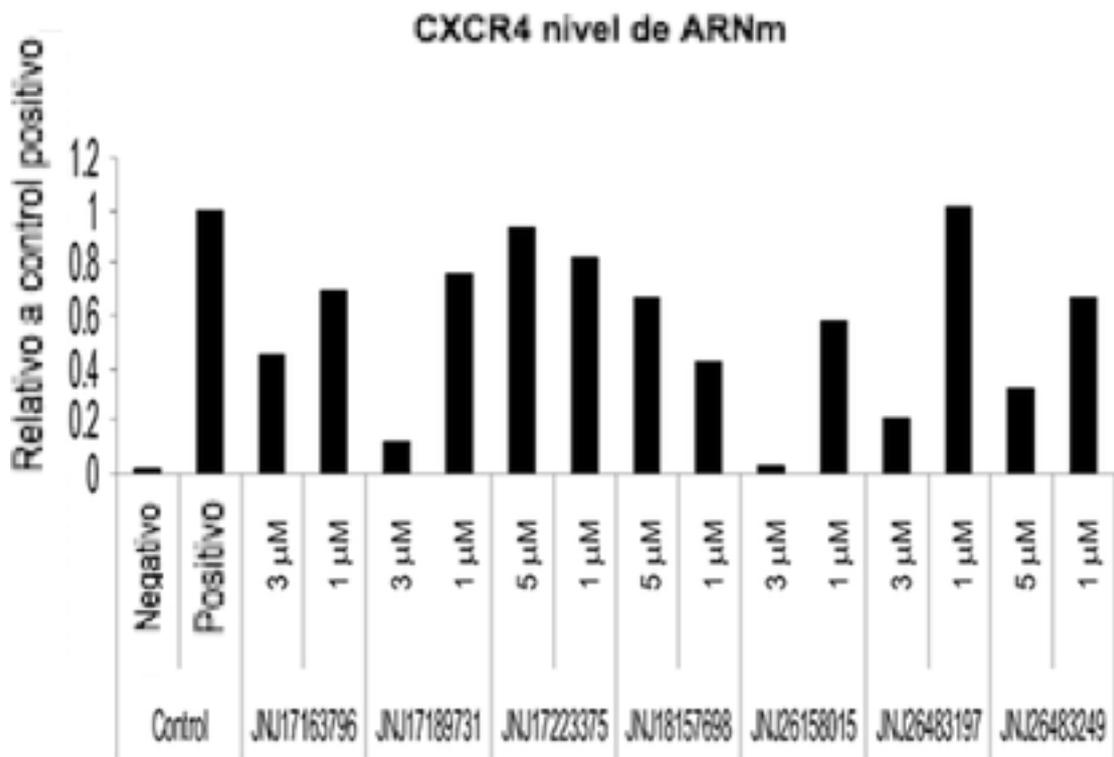


Figura 10-B

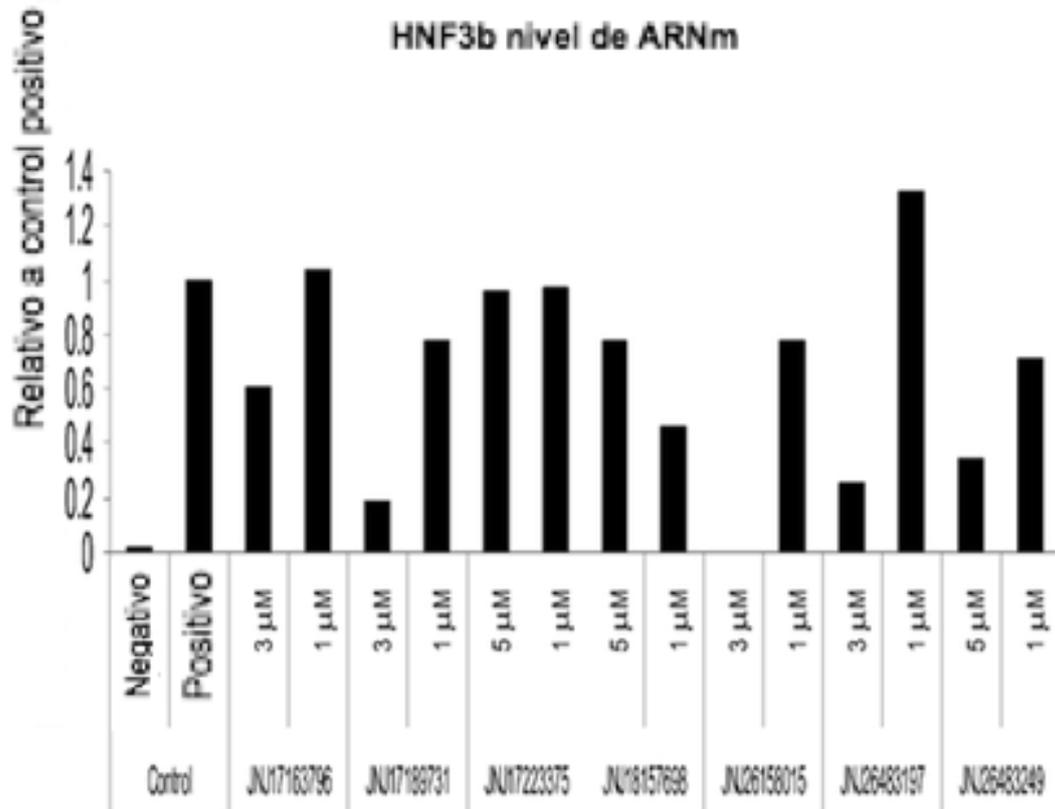


Figura 10-C

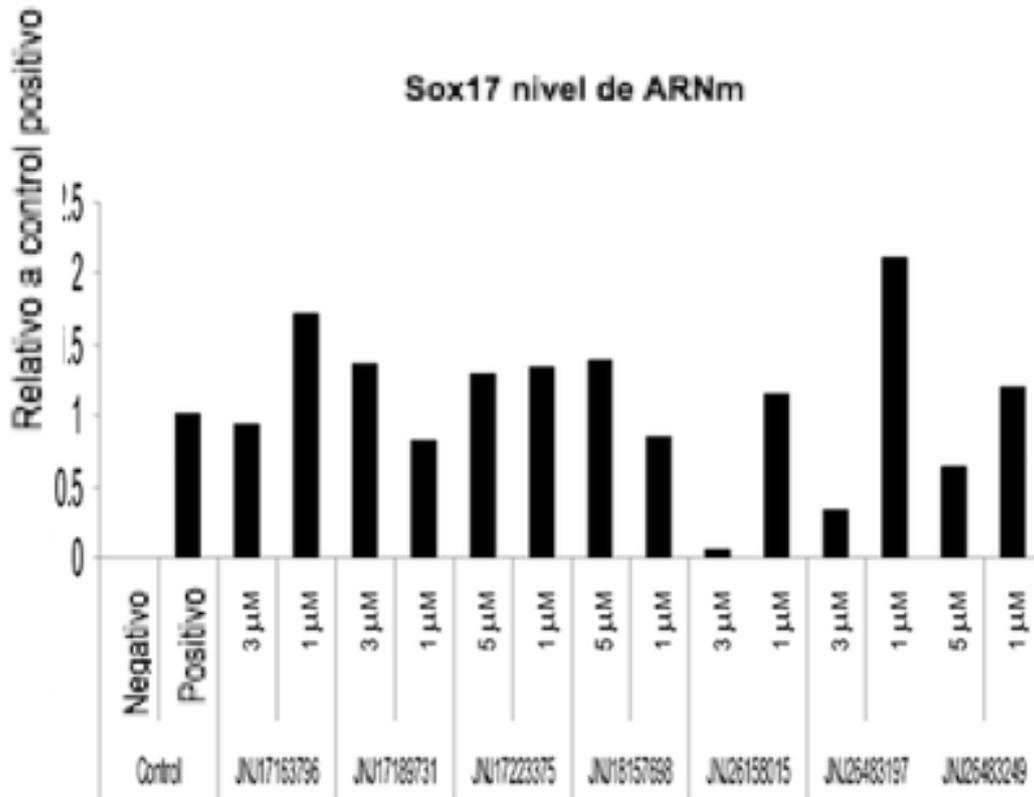


Figura 11-A

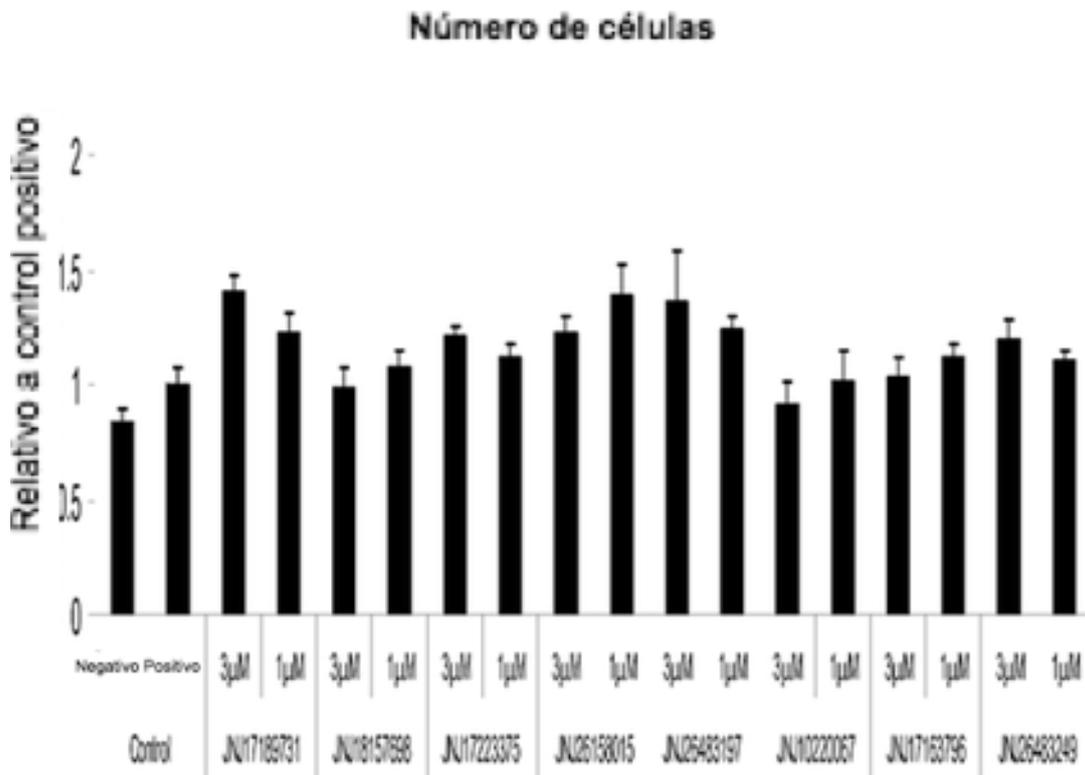


Figura 11-B

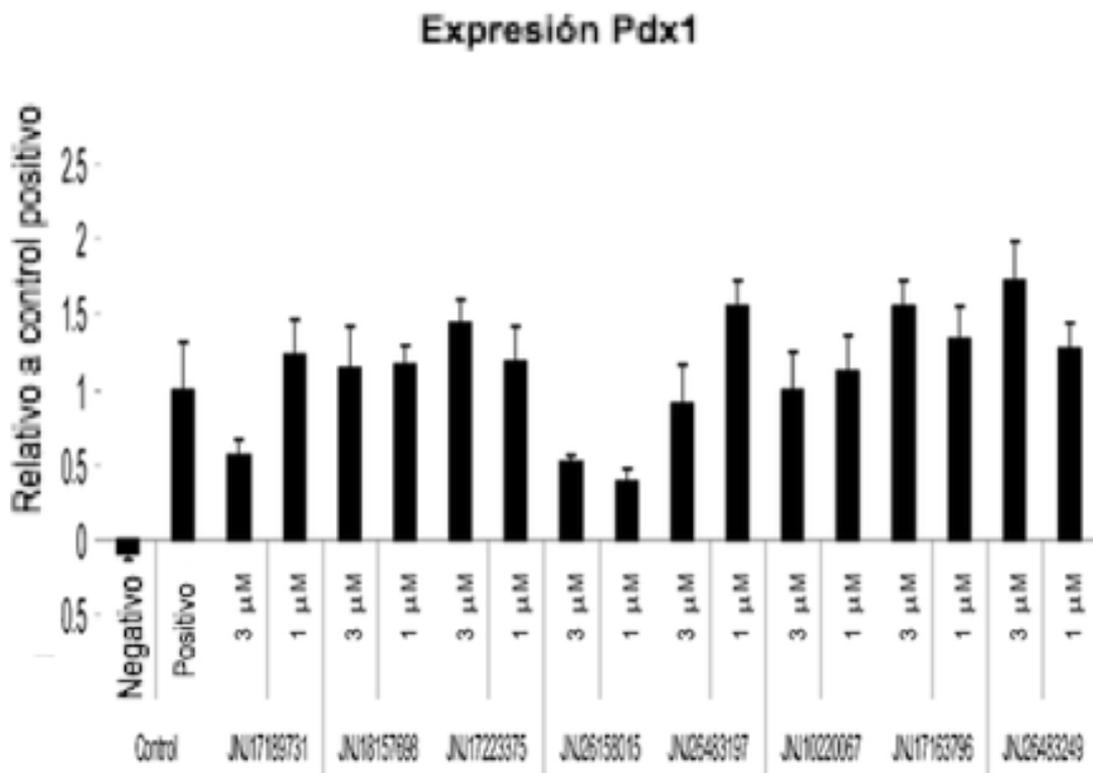


Figura 12

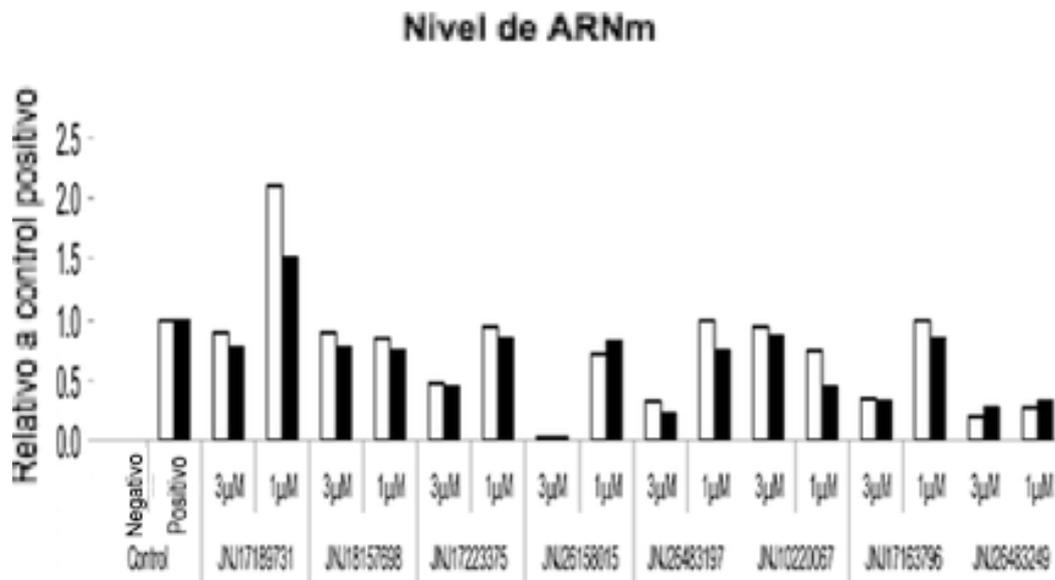


Figura 13-A

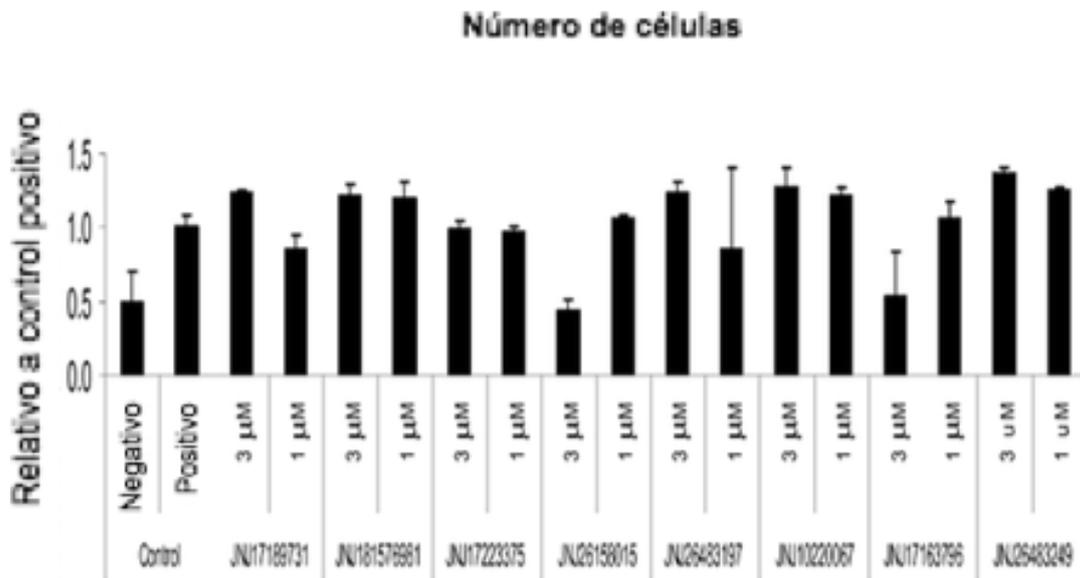


Figura 13-B

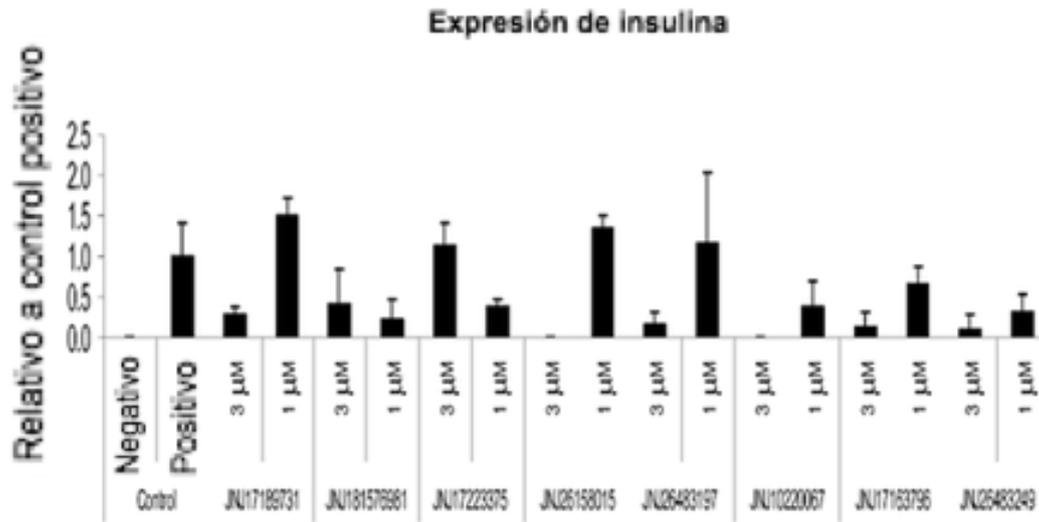


Figura 14

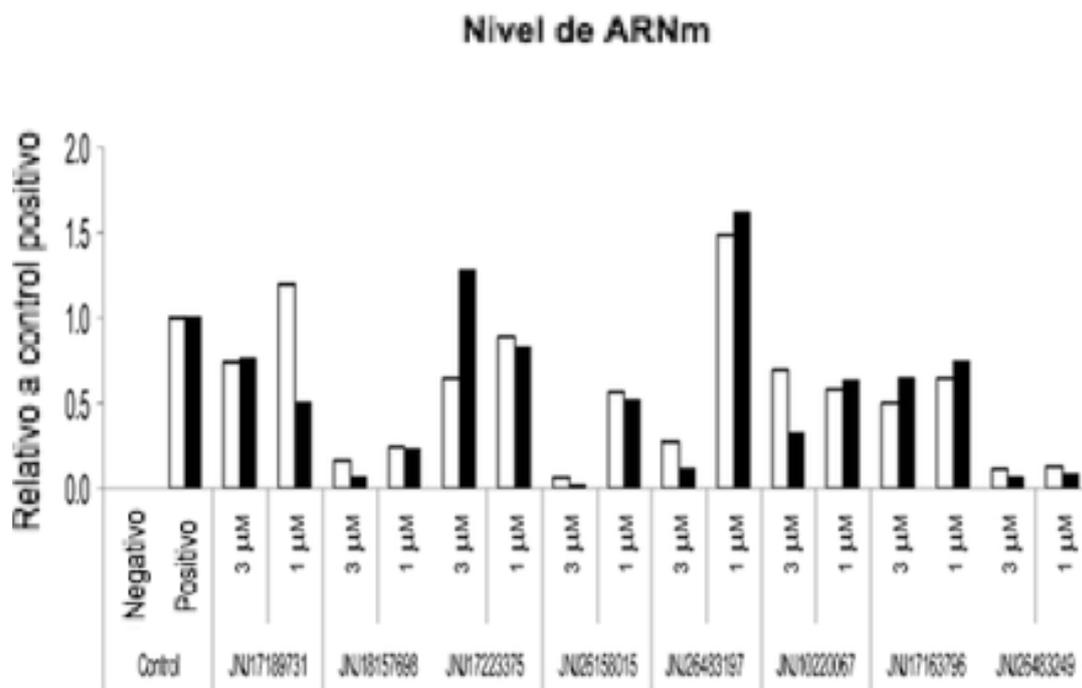


Figura 15-A

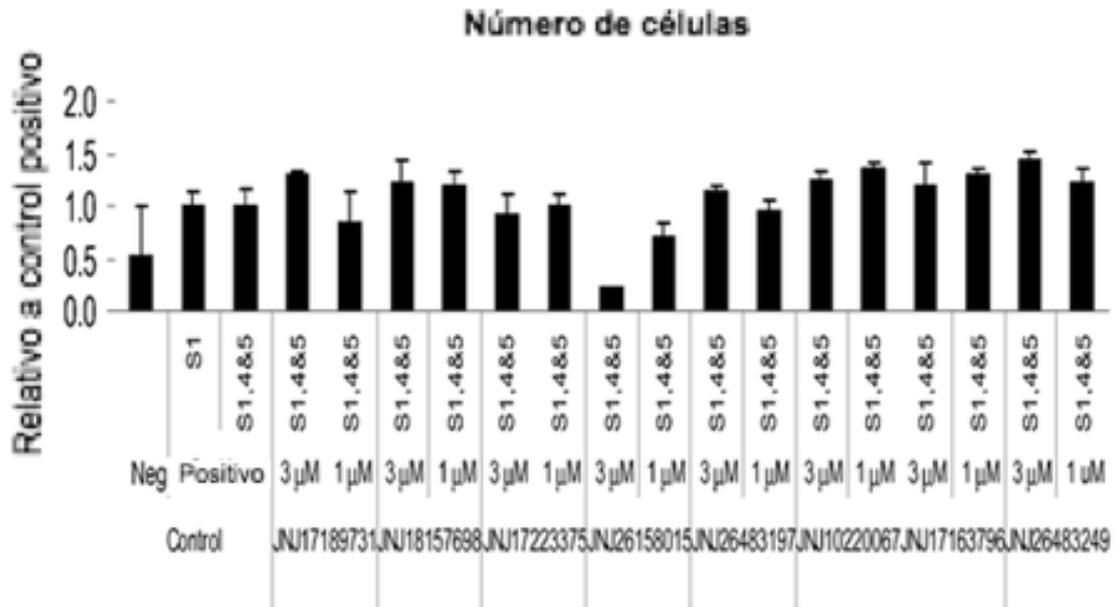


Figura 15-B

