



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 822**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/52** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06838470 .0**  
96 Fecha de presentación : **27.11.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1960777**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Expansión sin suero de células en cultivo.**

30 Prioridad: **28.11.2005 US 740173 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.02.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.02.2010**

73 Titular/es: **Choongwae Pharma Corporation**  
**698, Shindaebang-dong, Dongjak-ku**  
**Seoul 156-757, KR**

72 Inventor/es: **Kahn, Michael**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 332 822 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Expansión sin suero de células en cultivo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos y procedimientos para identificar compuestos capaces de promover la proliferación y evitar la diferenciación de células madre/progenitoras.

10 **Descripción de la técnica relacionada**

Las células madre han recibido un interés significativo durante los últimos años debido a su potencial, en micro-entornos celulares adecuados, para diferenciarse y desarrollarse en un gran conjunto de tipos de células y tejidos. Diversas aplicaciones biomédicas importantes serían posibles gracias a la capacidad de generar suficientes agrupamientos de células madre adultas, incluyendo terapia de sustitución celular, terapia génica, y modificación genética de tejidos. De acuerdo con los Institutos Nacionales de Salud, el uso terapéutico de células madre se convertirá en una piedra angular de la medicina en las próximas dos décadas:

Dado el enorme potencial de las células madre para desarrollar las nuevas terapias para las enfermedades más devastadoras, cuando se identifica una fuente de células madre fácilmente disponible, no es demasiado poco realista decir que esta investigación revolucionará la práctica de la medicina y mejorará la calidad y duración de la vida (National Institutes of Health. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. 17 de junio de 2001).

Sin embargo, el desarrollo de dichas aplicaciones para células madre adultas se ha visto gravemente afectado debido a la incapacidad para propagar y expandir las células madre adultas funcionales en cultivo. Hasta la fecha, esto ha resultado ser un desafío singular en la investigación de las células madre (Sherley, J. (2002) Stem Cells, 20: 561-572). Durante décadas, los científicos han intentado desarrollar células madre en cultivo para aumentar el número de células para trasplante. El desafío de esta tarea yace en la predisposición de las células madre para diferenciarse. Este problema puede asociarse con la cinética celular asimétrica inherente de las células madre en tejidos somáticos post-natales (Sherley, J. (2002) Stem Cells, 20: 561-572). Los procedimientos científicos existentes usados para aumentar el número de células madre incluyen cultivar células en capas estromales 2-D y desarrollarlas en presencia de diversos cócteles de citoquina (Rebel, VI, *et al.* (1994) Blood, 83(1 ):128-136). Sin embargo, ninguno de los procedimientos *ex vivo* existentes puede evitar la diferenciación de células madre mientras promueve la proliferación (Rebel, VI, *et al.* (1996) J Hematother, 5(1):25-37). Se conocen procedimientos de selección de compuestos útiles en el cultivo de células madre. Por ejemplo, el documento WO 03/104442 describe un procedimiento de selección de compuestos usando receptores particulares de tirosina quinasa como una diana para seleccionar agentes de unión. Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de otros compuestos y procedimientos para identificar compuestos capaces de propagar y expandir células madre adultas en cultivo.

40 **Breve resumen de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un agente como capaz de evitar la diferenciación mientras que promueve la proliferación de una célula madre de mamífero durante el cultivo *ex vivo*. El procedimiento comprende poner en contacto un agente con al menos una de las subunidades PR72/130 de la proteína fosfatasa serina/treonina PP2A y detectar la unión de dicho agente a dicha al menos una subunidad.

La unión puede detectarse por inmunotransferencia. Adicionalmente, el agente puede seleccionarse entre el grupo constituido por compuestos de fórmula 1-5, 7-12, 15 y 17-28.

50 **Breve descripción de los dibujos**

Los siguientes dibujos no representan directamente realizaciones de la invención, pero demuestran la actividad de compuestos que pueden identificarse de acuerdo con los procedimientos de la invención e indican ensayos que pueden usarse para demostrar la actividad de dichos compuestos.

Figura 1. Las Figuras 1A-D muestran que IQ-1 mantiene el estado no diferenciado de las ESC. Figura 1A, Estructura de IQ-1. Figura 1B, la dependencia de la dosis de IQ-1 mantiene la actividad de la fosfatasa alcalina. Figura 1C, la dependencia de la dosis de IQ-1 mantiene la expresión de SSEA-1. La expresión de SSEA-1 se analizó 7 días después de la adición de IQ-1. Figura 1D, IQ-1 permitió proliferar a las ESC en el estado no diferenciado durante al menos 65 días, sin suministradores de FEM o FIL. Las ESC, en medios complementados con 4 µg/ml de IQ-1, se hicieron pasar 2-3 veces cada semana a  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  células por platillo de 6 cm y se contaron. Todas las barras de error representan la media ± DT.

Figura 2. Las Figuras 2A-C muestran que IQ-1 mantenía la auto-renovación de las ESC independientemente de FIL. Figura 2A, IQ-1 aumenta la expresión génica de *Nanog* significativamente comparado con FIL. Se aisló ARNm de las ESC, se cultivó en un sistema sin suministrador, y en presencia de IQ-1 (4 µg/ml) o FIL (1000 U/ml) durante 21 h. Se realizó RT-PCR en tiempo real para *Nanog*. El control del nivel de expresión de *Nanog* en el día 0 se ajustó

a 1. Figura 2B, la retirada de IQ-1 disminuye la expresión génica de *Nanog* en las ESC. IQ-1 se retiró de las ESC que se habían cultivado en el sistema sin suministrador y en presencia de IQ-1 (4  $\mu\text{g/ml}$ ), durante tres días. Al final de este periodo, el ARNm se aisló y se realizó RT-PCR en tiempo real para ensayar la expresión génica de *Nanog*. Figura 2C, los efectos de IQ-1 no estaban mediados por la señalización de la ruta Stat3 según se juzgó por un ensayo con informador de luciferasa. Las ESC sin suministrador, transfectadas con el informador pSTAT3-TA-Luc, se expusieron a IQ-1 a las dosis indicadas, o FIL. Todas las barras de error representan la media  $\pm$  DT.

Figura 3. Las Figuras 3A-C muestran que IQ-1 modula la señalización de Wnt por interacción con PR72/130. Figura 3A, el aislamiento por cromatografía de afinidad de la diana o dianas moleculares de IQ-1 se realizó como se describe en los Procedimientos Experimentales. Las dos bandas a 72 kDa y 130 kDa (marcado) se identificaron por secuenciación espectral de masa como las subunidades reguladoras PR72/130 empalmadas diferencialmente de la proteína fosfatasa serina/treonina, PP2A. Figura 3B, se realizó la inmunotransferencia, usando antisuero PR72/130, para confirmar la identidad de las dos bandas. Figura 3C, IQ-1 provoca defectos de desarrollo en pez cebra. Los embriones de pez cebra en fase de 1 célula se trataron con IQ-1 1  $\mu\text{M}$  (Inferior) o DMSO como control (Superior) durante 24 h. Los resultados son representativos de al menos 10 embriones, a partir de tres experimentos independientes.

Figura 4. Las Figuras 4A-D muestran que el mantenimiento con IQ-1 de las ESC es dependiente de Wnt/ $\beta$ -catenina/CBP. Figura 4A, Modelo de Cambio de Coactivador Wnt/ $\beta$ -catenina. Figura 4B, IQ-1 aumentaba el complejo CBP/ $\beta$ -catenina a costa del complejo p300/ $\beta$ -catenina. Las células P19 se trataron con Wnt3A complementado con IQ-1, ICG-001 de CBP/ $\beta$ -catenina o DMSO como control. Los lisados nucleares se co-immunoprecipitaron con anticuerpo anti-CBP o anti-p300 y se inmunotransfirieron para  $\beta$ -catenina. Figura 4C, la fosforilación de Ser89 de p300, de una manera dependiente de PKC, aumentaba la interacción p300/ $\beta$ -catenina. Después de la fosforilación *in vitro* con PKC $\alpha$ , p300 de tipo silvestre (1-110 aa) y p300 mutante (p300 S89A) se mezclaron con lisados de P19 y se co-immunoprecipitaron usando el marcador HA. Se realizó el análisis por transferencia de Western para p300 (Superior) o  $\beta$ -catenina como control de carga (Inferior). Carril 1, unión p300/ $\beta$ -catenina Carril 2, unión de p300 fosforilado con PKC $\alpha$ / $\beta$ -catenina Carril 3, unión de p300 de S89A/ $\beta$ -catenina Carril 4, unión de p300 de S89A fosforilado con PKC $\alpha$ / $\beta$ -catenina. Figura 4D, IQ-1 disminuyó la fosforilación de p300, las células P19 se trataron con IQ-1 o DMSO (control) y se expusieron a Wnt3A purificado durante 24 horas. Los lisados celulares se inmunotransfirieron usando anticuerpos específicos para p300, o p300 fosforilado en la posición Ser 89 Carril 1 control negativo Carril 2, Wnt3a más DMSO como control, panel superior inmunotransferencia de p300 con fosfo Ser89, panel central inmunotransferencia de p300 Carril 3, Wnt3a más IQ-1, panel superior inmunotransferencia de p300 con fosfo Ser89, panel central inmunotransferencia de p300.

Figura 5. Las Figuras 5A-C muestran la pluripotencia de ESC cultivadas a largo plazo. Figura 5A, las ESC cultivadas a largo plazo se indujeron para formar cuerpos embrioides en cultivos en suspensión durante 3 días. Las ESC cultivadas en medios en presencia de Wnt3A y IQ-1 (4  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 48 días pudieron formar cuerpos embrioides (Izquierda). Las ESC perdieron su capacidad para formar cuerpos embrioides después de 3 días de cultivo en ausencia de IQ-1 (Derecha). Figura 5B, se cultivaron ESC tratadas con IQ-1 derivadas de cuerpos embrioides (cultivo de adherencia) durante 7-14 días para inducir diferenciación adicional. La tinción por inmunofluorescencia para  $\alpha$ -feto-proteína, actina de músculo liso, GATA4, MAP2,  $\beta$ -III tubulina y oligodendrocitos demostró que el cultivo a largo plazo de las ESC en presencia de IQ-1, mantiene la pluripotencia. Figura 5C, modelo que representa el mecanismo de acción propuesto de IQ-1.

Figura 6. La Figura 6 muestra el análisis del informador génico de FCT/ $\beta$ -catenina. La construcción informadora FCT/ $\beta$ -catenina TopFlash se transfectó complementariamente con una  $\beta$ -catenina constitutivamente activa en células NIH-3T3 - wt, CBP (+/-) y p300 (+/-) - en presencia o ausencia de IQ-1. No hubo efecto de IQ-1 sobre el informador Fopflash.

Figura 7. La Figura 7 muestra un cultivo a largo plazo de las ESC en un sistema sin suministrador con medios sin suero complementados con IQ-1 y Wnt3a purificado. Las ESC se cultivaron en KSR al 15%, 4  $\mu\text{g/ml}$  de IQ-1 y 100 ng/ml de Wnt3a. Las ESC se hicieron pasar 2-3 veces por semana a  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  células por platillo de 6 cm y las células se contaron.

Figura 8. La Figura 8 muestra que el mantenimiento con IQ-1 de la proliferación y pluripotencia de las ESC era dependiente de la señalización de Wnt en medios de KSR al 15%. Actividad FA de las ESC cultivadas durante 7 días en IQ-1 que contienen medios complementados con FCS al 15% o KSR al 15%. La adición de Wnt3a aumenta la actividad FA de las ESC cultivadas durante 7 días en medios que contienen KSR al 15% al mismo nivel que los medios que contienen FCS al 15%. (Las barras de error representan  $\pm$  D.T.)

Figura 9. La Figura 9 muestra RT-PCR en tiempo real realizado en ESC cultivadas en KSR al 15% complementado con IQ-1 y Wnt3a durante 42 días sin suministradores de FEM. Tras el periodo de 42 días de cultivo, las ESC cultivadas en los medios en presencia de IQ-1 y Wnt3a mantienen la expresión de los marcadores de pluripotencia, (a) *Nanog*, (b) *Oct3/4* y (c) *Rex-1*. El nivel de expresión en el día 0 se ajustó como 1.

Figura 10. La Figura 10 es una representación esquemática de dos mecanismos de acción posibles de  $\beta$ -catenina, resultantes de la interacción alternativa con CBP o p300 en el núcleo.

Figura 11. La Figura 11 ilustra que ICG-001 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  inducía la diferenciación de mioblastos C2C 12 en medios de crecimiento, similar a los medios de diferenciación, y comparado con el medio de crecimiento en solitario.

5 Figura 12. La Figura 12 ilustra que la diferenciación de los mioblastos C2C12 estaba inducida por ICG-001 10  $\mu\text{M}$  en medio de crecimiento, similar al medio de diferenciación.

### Descripción detallada de la invención

10 Las células madre son responsables de la regeneración y mantenimiento de tejidos equilibrando los procedimientos de auto-renovación (es decir, de creación de nuevas células madre) y diferenciación (es decir, generación de células comprometidas con la diferenciación terminal). Este equilibrio resulta de la integración de señales reguladoras intrínsecas a la célula madre, así como señales extrínsecas del microentorno. Las perturbaciones en el equilibrio entre auto-renovación y diferenciación puede dar como resultado enfermedad, bien como resultado del agotamiento de la célula madre (por ejemplo, anemia aplásica) o bien aumento de la auto-renovación (por ejemplo, cáncer). En la neurogénesis, los factores de transcripción Sox1, Sox 2 y Sox3 desempeñan un papel en el mantenimiento de las células neurales en un estado no diferenciado.

20 La mayor parte del conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la regulación de células madre en mamíferos procede de estudios del sistema hematopoyético. Hay una comprensión extensiva y en expansión de los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación a lo largo de los linajes terminales. Sin embargo, una comprensión mecanística de los mecanismos que regulan las decisiones determinantes de las células madre hematopoyéticas (CMH) se entiende bastante menos. Se han identificado unos pocos genes que, cuando se suprimen, dan como resultado una perturbación de la auto-renovación de las CMH (por ejemplo, TNF $\alpha$ -p55-Receptor, p21, Rae28, y Bmi-1) o una diferenciación alterada (por ejemplo, TEL, PU.1, Flt-3, y p27). La señalización de HoxB4,  $\beta$ -catenina, y Notch, por otro lado, estimulan la auto-renovación de las CMH cuando se sobre-expresan en CMH.

30 Un trabajo reciente ha demostrado que CBP y p300 desempeñan papeles importantes en la auto-renovación y diferenciación de CMH. CBP y p300 funcionan como integradores moleculares de diversas señales transcripcionales. Cuando se reclutan promotores mediante factores de transcripción, funcionan como co-activadores de transcripción mediante múltiples mecanismos, incluyendo remodelación de cromatina, acetilación de proteínas asociadas, y reclutamiento de la maquinaria de transcripción basal. CBP y p300 son altamente homólogos a un nivel estructural, con hasta un 93% de identidad centro de ciertos dominios de unión a proteína (SEC ID N°: 1 y 2). Para la mayoría de funciones, las dos proteínas parecen ser funcionalmente redundantes. Sin embargo, los estudios genéticos de pérdida de función en ratones demuestran una diferencia en la función de p300 y CBP en las CMH: la pérdida de CBP da como resultado una auto-renovación de CMH defectuosa, mientras que la pérdida de p300 da como resultado una diferenciación hematopoyética defectuosa.

40 Se ha mostrado previamente que CBP y p300 interactúan con muchos de los factores de transcripción conocidos que se ha mostrado que son importantes en la regulación de CMH (por ejemplo, HoxB4,  $\beta$ -catenina, Notch, AML-1, MLL). Los resultados anteriores sugieren que dentro de las CMH puede haber factores de transcripción que se co-activen específicamente mediante CBP que son críticos para la auto-renovación, y otros que se co-activan preferentemente mediante p300 que se requieren de forma crítica para la diferenciación. Un ejemplo de una ruta de señalización que parece utilizar CBP y p300 diferencialmente es la señalización de la ruta de Wnt. Se ha demostrado que la señalización de la ruta de Wnt desempeña un papel pertinente en el desarrollo y mantenimiento de diversos tejidos, incluyendo sangre, intestinos, y piel. Sus efectos se ejecutan al nivel de las células madre y progenitoras, afectando tanto a la auto-renovación como a la diferenciación. Además, la importancia de la señalización de Wnt para mantener las características no diferenciadas de las células madre embrionarias (ES) se ha establecido bien. Es importante destacar que, cuando la señalización de Wnt se altera puede conducir al desarrollo de cáncer en estos mismos tejidos.

50  $\beta$ -catenina (SEC ID N°: 3) es un homólogo vertebrado del gen armadillo de *Drosophila*, que funciona tanto en la adhesión celular como, como se analiza en el presente documento, en la ruta de señalización de Wnt.  $\gamma$ -catenina (SEC ID N°: 4) también es un homólogo vertebrado de armadillo.  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina tienen estructuras y funciones análogas, y tienen la capacidad de regularse mediante el supresor de tumores APC.

55 La activación de la señalización de la ruta de Wnt requiere la estabilización nuclear de los complejos FCT (factor de célula T)/ $\beta$ -catenina y el reclutamiento de co-activadores transcripcionales, tales como CBP y p300.  $\beta$ -catenina se produce constitutivamente en la célula, y existen mecanismos inhibidores para mantener los niveles de  $\beta$ -catenina por debajo de aquellos que conducirían a una actividad transcripcional aberrante *in vivo*, que conduce a afecciones patológicas tales como cáncer. En un ejemplo de regulación aberrante, Emami y colaboradores (PNAS, 101,12682-7, 2004) demostraron recientemente que  $\beta$ -catenina se asocia preferentemente con CBP en células cancerosas. Sin embargo, cuando se evitaba que  $\beta$ -catenina se asocie con CBP, utilizando un inhibidor específico para  $\beta$ -catenina/CBP, la  $\beta$ -catenina podría unirse a p300. La unión "alternativa" de  $\beta$ -catenina a p300 iba acompañada de la ejecución de un programa genético diferenciativo (Teo *et al.* presentado en PNAS). De esta manera, se cree que la  $\beta$ -catenina promueve la proliferación sin diferenciación uniéndose a y activando CBP, e inicia la diferenciación con proliferación limitada uniéndose a y activando p300. Por lo tanto, se espera que la perturbación de la interacción de  $\beta$ -catenina con CBP y/o p300 influya en la diferenciación o en la proliferación.

La terapia con células madre se basa en la capacidad de las células madre humanas, fetales o adultas, pluripotentes para diferenciarse en diversos tipos de células. Las células madre pueden usarse para sustituir las células dañadas como un tratamiento para muchas enfermedades diferentes incluyendo cáncer, enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, quemaduras, diabetes, enfermedad coronaria, artritis reumatoide, y osteoartritis y para terapia génica (Lazic, S.É. *et al.* J Hematother Stem Cell Res, 12(6):635-642, Gafni, Y. *et al.* Gene Ther, 11(4):417-426). La terapia con células madre ha sido desde hace tiempo un avance médico potencial excitante. La capacidad de inyectar células madre normales en un paciente, donde pueden generar células específicas para un órgano o sustituir potencialmente los tejidos defectuosos de un paciente, ofrece un enorme potencial.

Las células madre embrionarias (células ES) representan una importante herramienta de investigación y un recurso potencial para la medicina regenerativa. Generalmente, las células ES se cultivan con una capa de células suministradoras de soporte de fibroblastos embrionarios murinos (FEM). La capa de suministrador de FEM suministra factores que mantienen la capacidad de las la célula ES para auto-renovarse y diferenciarse espontáneamente en bloque. Estas condiciones incómodas, así como el riesgo de contaminación xenobiótica de las células ES humanas cultivadas en los FEM, hace prioritario desarrollar medios definidos químicamente que puedan utilizarse de forma segura para la expansión de las células ES. Usando una selección basada en la producción celular, la molécula pequeña IQ-1 se identificó como un compuesto que permitía la expansión de células ES de ratón sin una capa suministradora de FEM o la adición del factor inhibidor de leucemia (FIL), y evitaba la diferenciación espontánea. Se ha determinado también que IQ-1 evita que  $\beta$ -catenina cambie el uso del coactivador de CBP a p300. El aumento en la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina/CBP a costa de la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina/p300 es crítico para el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre.

Las células ES derivadas de la masa celular interna de los embriones puede cultivarse conjuntamente en capas celulares de fibroblastos embrionarios. Más recientemente, Xu *et al.* (Xu *et al.* Nat. Biotech. 2001, 19, 971) demostraron que las células ES humanas pueden desarrollarse en condiciones sin suministrador utilizando un medio acondicionado con FEM. Sin embargo, las variaciones en los medios acondicionados con FEM y FEM, la ausencia de conocimiento sobre qué factores son importantes en los medios acondicionados y preocupaciones sobre la contaminación zoonótica enfatizan la necesidad de condiciones químicamente definidas para expandir las células ES.

La capacidad para mantener células madre adultas de piel *in vitro* ha permitido el injerto de piel cultivada en víctimas de quemaduras (Green, H. (1991) Sci Am, 265:96-102). Además, actualmente, hay tres células madre adultas relacionadas con los procedimientos de trasplante usados para la reconstitución hematopoyética: trasplante de médula ósea (TMO), trasplante de células madre de sangre periférica (TCMSP) y trasplante de células madre de sangre del cordón umbilical (TCMSCU). La dos primeras técnicas de reconstitución hematopoyética, TMO y TCMSP, padecen problemas de correspondencia significativos con los donantes alogénicos. El grado de correspondencia requerido para un trasplante exitoso parece ser menos riguroso para TCMSCU que para TMO o TCMSP. Sin embargo, el volumen relativamente menor de células madre recolectadas y la disponibilidad de sólo una unidad de sangre de cordón umbilical recogida por procedimiento de trasplante limitan la gran aplicabilidad de TCMSCU (McCaffrey, P. *Lancet Oncol.*, 6 (1): 5, 2005). Una solución a este problema es la expansión *ex vivo* de las células madre de la sangre del cordón umbilical. Sin embargo, hay un obstáculo significativo que superar para proporcionar esta sencilla solución.

#### *Células Madre y “Células Madre” Cancerosas*

Una característica unificadora de todos los cánceres es su capacidad de auto-renovación ilimitada, que es también una característica determinante de las células madre normales. Décadas atrás, se descubrió que la capacidad proliferativa de todas las células cancerosas no era equivalente, y sólo una pequeña minoría de células tumorales era capaz de proliferar extensivamente (Hamburger) AW, *et al.* (1977) Science, 197 (4302): 461 - 463). Esto dio lugar al concepto de que los tumores malignos están compuestos por *Células Madre Cancerosas*, que tienen un gran potencial proliferativo, así como otro agrupamiento de células cancerosas más diferenciadas, con capacidad proliferativa limitada. Una implicación importante de la hipótesis de las *Células Madre Cancerosas* es que hay similitudes mecánicas entre la auto-renovación de las células madre normales y la proliferación de las células madre cancerosas (Pardal, R. *et al.* (2003) Nat Rev Cancer, 3(12): 895-902). Estudios recientes han demostrado que productos génicos específicos regulan tanto la auto-renovación de las células madre somáticas normales, como la proliferación de células cancerosas (Park, IK. *et al.* (2003) Nature 423:302-305; Lessard, J. *et al.* (2003) Nature, 423(6937):255-260). Esto implica que se utilizan mecanismos similares tanto en células madre como en células cancerosas para mantener un estado proliferativo, no diferenciado.

#### *Señalización Wnt en Células Madre y Cáncer*

La ruta Wnt/ $\beta$ -catenina inicia una cascada de señalización crítica tanto en el desarrollo normal como en el comienzo y progreso del cáncer (Giles, RH *et al.* (2003) Biochim Biophys Acta, 1653(1): 1-24; Wodarz, A. *et al.* (1998) Annu Rev Cell Dev Biol, 14:59-88). Se ha demostrado que la señalización de Wnt y en particular las funciones nucleares de  $\beta$ -catenina son importantes en el mantenimiento, proliferación así como en la diferenciación de células madre (Song, X. *et al.* (2003) Development, 130(14): 3259-3268). Algunas de las características sobresalientes de esta ruta de señalización, se resumen en la Figura 1. La ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina normalmente regula la expresión de un intervalo de genes implicados en promover tanto la proliferación como la diferenciación. La activación de la ruta de Wnt permite que la  $\beta$ -catenina se acumule en el núcleo, se una a miembros de la familia FCT de factores de transcripción, y forme un complejo transcripcionalmente activo, reclutando el coactivador transcripcional CBP o su homólogo muy

relacionado, p300. Sin embargo, en más del 85% de cánceres de colon, las mutaciones en esta ruta conducen a la activación y expresión constitutiva de genes diana, por ejemplo c-myc, ciclina D1 y survivina, todos los cuales son críticos para la proliferación celular rápida (Kolligs, FT. *et al.* (1999) *Mol Cell Biol*, 19(8):5696-5706; Tetsu, O. *et al.* (1999) *Nature*, 398(6726):422-426; Kim, P.J. *et al.* (2003) *Lancet*, 362:205-209). De esta manera, la tumorigénesis en el epitelio intestinal parece estar causada por la hiper-proliferación inducida por Wnt/ $\beta$ -catenina de células madre crypt intestinales, seguido de la acumulación de las mutaciones adicionales que confieren malignidad y progreso del cáncer. También se ha demostrado que la señalización de Wnt es importante para el mantenimiento de la pluripotencia tanto en células madre embrionarias en cultivo tanto de ratón como humanas (Sato, N. *et al.* (2004) *Nat Med*, 10(1):55-63). La expresión de múltiples componentes de la ruta de Wnt es evidente en las líneas celulares de carcinoma embrionario humanas P19, así como en células madre embrionarias (Walsh, J. *et al.* (2003) *APMIS*, 111(1):197-211).

#### *Wnt y Células Madre Hematopoyéticas (CMH)*

La auto-renovación de células madre hematopoyéticas (CMH) se promueve también por señalización de Wnt. La sobreexpresión de  $\beta$ -catenina estabilizada en CMH de médula ósea cultivadas de ratones aumentó el número de estas células en cultivo a largo plazo medido por su capacidad para reconstituir los sistemas hematopoyéticos de ratones después de la irradiación. Además, las Wnt3a purificadas promovían la auto-renovación pero sólo inhibían parcialmente la diferenciación de CMH en cultivo (Reya, T. *et al.* (2003) *Nature*, 423(6938):409-414).

#### *Uso del Coactivador Diferencial en la Señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina*

Como se ha analizado anteriormente, las funciones de CBP y p300 se han descrito como redundantes en diversos estudios (revisado en Goodman, RH. *et al.* (2000) *Genes Dev*, 14(13):1553-1577) y su patrón de expresión durante el desarrollo del ratón es casi idéntico (Partanen, A. *et al.* (1999) *Int J Dev Biol*, 43(6):487-494). Sin embargo, cada vez está más claro que estos coactivadores altamente homólogos no son redundantes en condiciones fisiológicas, y son responsables de distintos programas transcripcionales: Rebel *et al.* (Rebel, V.I. *et al.* (2003) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 99(23): 14789-14794), usando células de ratones knockout, demostraron que una dosis completa de CBP, pero no de p300, es crítica para la auto-renovación de CMH. A la inversa, p300 pero no CBP, es esencial para la diferenciación hematopoyética apropiada. Análogamente, Eckner y colaboradores (Roth, J.F. *et al.* (2003) *Embo J*, 22(19):5186-5196) demostraron un papel crítico para la actividad histona acetil-transferasa de las p300 (HAT) pero no de las actividades HAT de las CBP. Estos estudios y otros demuestran claramente que CBP y p300 desempeñan papeles no redundantes y distintos durante el desarrollo.

A partir de los estudios quimiogénómicos previos del inventor con el inhibidor de molécula pequeña de la interacción  $\beta$ -catenina/CBP y la creación del perfil de la expresión génica adicional, se desarrolló un modelo que describe cómo el uso del coactivador diferencial en la señalización de Wnt controla la proliferación frente a la diferenciación. La característica crítica de este modelo es que el brazo CBP (Figura 10, lado izquierdo) de la ruta es esencial para la proliferación sin diferenciación, por ejemplo en cáncer o células madre, mientras que el brazo p300 (Figura 10, lado derecho) es crítico para la diferenciación, con una proliferación limitada. ICG-001 inhibe específicamente la transcripción dependiente de  $\beta$ -catenina/CBP (es decir, el brazo izquierdo de la ruta), induciendo así selectivamente la muerte celular programada en células cancerosas (Emami, K.H. *et al.* (2003) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 101,12682-7,2004), e induciendo la diferenciación de las células precursoras no tumorigénicas, por ejemplo los mioblastos C2C12 (Figuras 11 y 12) y los preadipocitos 3T3-L1.

Sin ceñirse a un mecanismo específico, la premisa es que inhibir o modular a la baja selectivamente la interacción  $\beta$ -catenina/p300 (es decir, el lado derecho de la ruta, Figura 10) permite la proliferación sin diferenciación de células madre pluripotentes. La invención trata en parte también del descubrimiento de un mecanismo que implica la unión selectiva de un compuesto o agente a una o más de las subunidades PR72/130 de la proteína fosfatasa serina/treonina PP2A, como se describe con más detalle en el Ejemplo 1 en el presente documento. El agente puede tener actividad similar a IQ-1.

La serina/treonina fosfatasa PP2A está implicada en la regulación de la señalización intracelular, expresión génica y progreso del ciclo celular. Una función principal de PP2A es regular las cascadas de señalización oponiendo la actividad de serina/treonina quinasas (20). PP2A está constituida por un complejo multisubunidad. Los componentes del núcleo de este complejo trimérico son una subunidad catalítica de 36 kDa, una subunidad reguladora de 65 kDa (PR65) y una tercera una subunidad variable, una de las cuales es PR72/130. PR72/130 representa formas empalmadas diferencialmente selectivas para tejidos del mismo gen (21). PP2A regula la señalización de la cascada de Wnt a múltiples niveles (22,23). Recientemente, se ha demostrado que PR72/130 interacciona con la proteína cutícula desnuda (Nkd), un componente regulador negativo de la señalización de la ruta de Wnt (24), modulando de esta manera la señalización de Wnt (25). Creighton *et al.*, usando morfollinos en embriones de xenopus, demostraron que PR72 como Nkd, es un regulador “negativo” de la señalización “canónica” de Wnt/ $\beta$ -catenina y está implicado en el cambio de la señalización “canónica” de Wnt a la extensión convergente “no canónica” (25).

Para el mantenimiento de la proliferación de células madre hematopoyéticas, un agente puede “modular” la proliferación de las células madre afectando a las modificaciones post-traduccionales de cualquiera de CBP, p300, o  $\beta$ -catenina, conduciendo a un aumento selectivo de la interacción de  $\beta$ -catenina con CBP o una disminución selectiva de la interacción de  $\beta$ -catenina con p300, en la que el agente no se une directamente a CBP o p300. Por “interactuar” e “interacción” se entiende la relación biológica normal entre dos o más moléculas, en este caso  $\beta$ -catenina

con CBP o p300. El agente puede aumentar la unión de  $\beta$ -catenina a CBP, o el agente puede disminuir la unión de  $\beta$ -catenina a p300. De cualquier forma, el resultado global desvía la ruta de  $\beta$ -catenina hacia el “programa proliferativo/de no diferenciación” de las células diana, que pueden ser células madre adultas, tales como células madre hematopoyéticas, células madre neurales o células madre de la piel. Un agente “modulará” la proliferación de las células madre si las células madre experimentan más proliferación y/o menos diferenciación que en ausencia del agente. Por ejemplo, con referencia a la Figura 5C, la unión preferente de  $\beta$ -catenina a CBP, con menor unión a p300, está asociada con el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas en un estado no diferenciado en el que experimentan una proliferación continua, que da como resultado un mayor número de células no diferenciadas útiles para la repoblación del sistema hematopoyético de un mamífero, tal como un ser humano, en necesidad de dicho tratamiento. Dicha modulación puede medirse usando, por ejemplo, los ensayos descritos en los Ejemplos en el presente documento.

Los agentes adecuados para dicho uso pueden seleccionarse usando procedimientos de co-inmunoprecipitación como se describe en Emami *et al.* PNAS, 101,12682-7, 2004. En resumen, las células diana, en este caso CMH, se transfectan con  $\beta$ -catenina de longitud completa o con p300 de longitud completa. Los lisados nucleares se tratan con un agente de ensayo radiomarcado solo, o con agente de ensayo frío. El agente de ensayo radiomarcado no unido se retira, y se mide la incorporación del agente de ensayo radiomarcado. Los resultados indican si el agente de ensayo interacciona específicamente o no con p300.

Una serie separada de experimentos puede demostrar la inhibición de la interacción de  $\beta$ -catenina con p300. El dominio de unión mínimo de CBP (aminoácidos 1-111), p300 (aminoácidos 1-111) y la región C-terminal de  $\beta$ -catenina (SEC ID N°: 3) (aminoácidos 647-781) se expresa en células de mamífero tratadas con los agentes apropiados para modificar la interacción y purificación,  $\beta$ -catenina se une a perlas de proteína A-agarosa recubiertas con anticuerpo específico para  $\beta$ -catenina e incubadas con CBP o p300. Las proteínas no unidas se retiraron por lavado, después las interacciones específicas entre  $\beta$ -catenina y p300, y  $\beta$ -catenina y CBP, se estimulan usando el agente de ensayo, para ensayar los compuestos que se unen directamente a CBP o fosfo Ser89 p300. Los agentes que aumentan la unión de  $\beta$ -catenina a CBP o disminuyen la unión de  $\beta$ -catenina a p300 se ensayan adicionalmente *in vitro* usando un modelo adecuado de proliferación/diferenciación de células madre hematopoyéticas. Uno de estos modelos se describe en Rebel, V. I. *et al.*, PNAS 99:14789-14794, 2002.

Los agentes adecuados pueden conseguir los efectos biológicos deseados mediante uno de varios mecanismos. En cada caso, la referencia a “aumento” o “disminución” se refiere a los resultados del ensayo o a los efectos biológicos relativos a los valores en ausencia del agente. Por ejemplo, el agente puede aumentar la unión de  $\beta$ -catenina a los 110 aminoácidos amino-terminales de CBP, o puede disminuir la unión de  $\beta$ -catenina a los 110 aminoácidos amino-terminales de p300. La disminución en la unión de  $\beta$ -catenina a p300 puede conseguirse inhibiendo la fosforilación de Ser 89 de p300, en la que la fosforilación está catalizada por la proteína quinasa C-épsilon (PKC), proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK), receptor-4 activado por proteasa (PAR-4), receptor-1 activado por proteasa (PAR-1), u otra proteína serina/treonina quinasa directa o indirectamente a través de una cascada quinasa.

La menor fosforilación de Ser 89 de p300 puede conseguirse aumentando la fosforilación de Ser 90, por ejemplo mediante proteína quinasa 4 activada por mitógenos (MAPK), quinasa dependiente de ciclina (CDK), u otra proteína serina/treonina quinasa.

Un agente preferible puede modular la interacción de Ser 89-p300 fosforilado con proteínas 14-3-3. Dichos agentes pueden ser análogos de Fusicoccina. La Fusicoccina es una toxina fúngica que se usa para estudiar la activación de H<sup>+</sup>-ATPasa. El mecanismo implica inducir un enlace irreversible entre la parte C-terminal de H<sup>+</sup>-ATPasa, y la proteína 14-3-3. (Svennilid, F. *et al.*, Plant Cell 11:2379-2392, 1999). Como resultado, el dominio de auto-inhibición C-terminal se desplaza. Análogamente, los análogos de Fusicoccina pueden modular la interacción de Ser-89 p300 fosforilado con proteínas 14-3-3, dando como resultado la reducción de la interacción de p300 con  $\beta$ -catenina.

El agente puede modular la interacción de Pin1 con  $\beta$ -catenina o con CBP o p300. Por ejemplo, el agente puede aumentar la asociación de Pin1 con  $\beta$ -Catenina/CBP. Pin1 (prolil isomerasa) se ha visto implicada en mecanismos del cáncer inhibiendo la interacción de  $\beta$ -catenina con el supresor tumoral APC. Se ha informado que la sobreexpresión de Pin1 ocurre en cáncer de mama humano. (Ryo, A. *et al.*, Nat. Cell Biol. 3:793-801 (2001)). Pin1 también se ha visto implicado en la espermatogénesis normal. Atchison, F.W. *et al.* (Biol. Reprod. 69:1989-1997, 2003) informaron que ratones adultos deficientes en Pin1 mostraban evidencia de un agotamiento acelerado de células madre potenciales, y una posible desviación hacia la ruta de diferenciación en ausencia de Pin1.

La fosforilación afecta a la conformación de proteínas y crea condiciones para unir los transductores de señal a ciertos dominios adecuados capaces de reconocer el resto o restos fosforilados. Pin1 reconoce específicamente enlaces S/T-P fosforilados (motivos Ser/Thr-Pro). Por ejemplo, Pin1 se une directamente al motivo Ser-Pro fosforilado (Ser 246-Pro) cerca del sitio de unión a APC en  $\beta$ -catenina, inhibe la interacción de  $\beta$ -catenina con la proteína poliposis adenomatosa coli (APC), y aumenta de esta manera su translocación en el núcleo. (Ryo, A. *et al.*, Nature Cell Biol. 3:793-801, 2001).

Pin1 también puede afectar a las interacciones del coactivador con factores de transcripción. p73 es un factor de transcripción relacionado con el supresor tumoral p53. p73 modificado con Pin1 presentaba una mayor afinidad por p300 que p73 no modificado. (Montovani, F. *et al.*, Mol. Cell 14:625-636, 2004). Análogamente, la unión de

Pin1 a  $\beta$ -catenina fosforilada puede aumentar la interacción  $\beta$ -catenina/CBP y, de esta manera, la transcripción génica dependiente de  $\beta$ -catenina/CBP que promueve la proliferación a costa de la diferenciación.

Dichos agentes pueden incorporarse en biomateriales en los que se desarrollan las células madre hematopoyéticas. Los ejemplos se describen en Horak *et al.*, Biomateriales 25, 5249-60, 2004 y Harrison *et al.* Biomaterials 25, 4977-86, 2004.

Aunque las células madre hematopoyéticas se describen en el presente documento como una diana de los procedimientos mencionados anteriormente, los procedimientos son aplicables a cualquiera de las células madre adultas de mamífero (o células ES no derivadas de embriones humanos) que pueden usarse para la regeneración de tejidos. Las células madre adultas constituyen una población de células no diferenciadas que retienen la capacidad de proliferar durante toda la vida postnatal y diferenciarse en células especializadas para sustituir las células que enferman, mueren o se pierden. (Agrawal, S. *et al.*; Trends in Biotechnology 23:78-83, 2005). Además de CMH, las células madre adecuadas para usar en los procedimientos anteriores incluyen células madre neurales, células madre de la piel, células madre del músculo, y células de la isleta pancreática.

El objetivo del tratamiento de la diabetes es restablecer los números normales y la función de las células  $\beta$  productoras de insulina. Trucco, M. (J. Clin. Invest. 115:5-12, 2005) analizan la existencia de células precursoras pancreáticas adultas que pueden generar células  $\beta$ , y se denominan precursores multipotentes derivados del páncreas. Otras células madre pueden inducirse a dirigir su diferenciación hacia la célula  $\beta$ . Para cualquiera de estas fuentes de células  $\beta$ , los procedimientos y agentes analizados anteriormente son adecuados para inducir la proliferación y limitar la diferenciación, para conseguir un número adecuado de células para uso terapéutico.

Las células madre neurales adultas pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos, y oligodendrocitos, que son los tres linajes principales del sistema nervioso adulto. Puede ser apropiado manipular las células madre neurales adultas *in situ* para conseguir neurogeneración *in vivo*. Las células madre activas existen en el cerebro adulto en la región del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular del prosencéfalo, y estas células madre pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Además, existen agrupamientos de células madre inactivas en la médula espinal, sustancia negra, nervio óptico, e hipotálamo. (Agrawal, S. *et al.*, 2005). De esta manera, agrupamientos definidos de células madre neurales están disponibles para modulación.

Las células madre de la piel pueden inducirse para proliferar *in vivo* para potenciar o restaurar el crecimiento capilar. Evidencias recientes sugieren que la ruta de Wnt está implicada en la capacidad de las células epiteliales de la piel para adquirir y/o mantener las características de las células madre multipotentes. (Alonso, L. *et al.*; PNAS 100:11830-11835, 2003). Las células madre multipotentes en la piel reciben las señales de Wnt antes de ser destinadas a la formación de folículos pilosos. En piel de ratón transgénico en la que  $\beta$ -catenina está estabilizada constitutivamente, la epidermis interfolicular adulta asume características de la piel embrionaria, y puede tener la capacidad de desarrollarse en folículos pilosos. (Gat, V., Cell 95:605-614, 1998). De esta manera, los agentes y procedimientos analizados anteriormente son adecuados para potenciar la proliferación de células madre multipotentes en la piel, proporcionando un depósito de células capaz de formar folículos pilosos para aumentar o sustituir el crecimiento del cabello perdido, incluyendo aplicaciones *in vivo*, por ejemplo mediante uso tópico. La Patente de Estados Unidos N° 6.419.913 describe composiciones adecuadas para el suministro tópico de agentes terapéuticos incluyendo agentes para el tratamiento de la pérdida del cabello. La Patente de Estados Unidos N° 6.680.344 describe también el suministro tópico de agentes para tratar la pérdida del cabello.

Además de usar las células madre después de la proliferación inducida por los agentes y procedimientos analizados anteriormente, también es posible alterar las células madre antes de su uso, por terapia génica. Se contemplan procedimientos para potenciar la proliferación de células madre de mamífero que expresan un gen exógeno, antes de la administración de las células para uso terapéutico. La terapia génica puede realizarse también *in vivo*, por ejemplo, para alterar la diferenciación potencial de células madre neurales. (Gomes, W. A. *et al.*, Dev. Biol. 255:164-177, 2003; Pardridge, W.M., Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 6:683-691, 2003).

Un ensayo adecuado para determinar si las células madre de mamífero se mantienen o no en un estado no diferenciado implica el uso de un informador génico bajo el control del promotor OCT4. OCT4 es un marcador conocido del estado no diferenciado de las células madre/progenitoras, y la región promotora puede unirse funcionalmente a un informador génico tal como PFVP (proteína fluorescente verde potenciada) como se describe en Gerrard, L. *et al.*, Stem Cells 23:124-133 (2005), o luciferasa. Usando cualquier informador génico, las células se transfectan con una construcción de OCT4-informador génico usando los procedimientos descritos en Gerrard *et al.* (2005) y puede ensayarse el efecto de agentes adecuado sobre el estado no diferenciado frente al estado de diferenciación de las células.

Los procedimientos para ensayar el efecto de las moléculas pequeñas sobre células madre *in vitro* incluyen aquellos descritos por Chen, J. K. *et al.*, P.N.A.S. 99:14701-14076 (2002) y Franlt-Kamenetsky, M. *et al.*, J. Biol 1:10 (2002).

Las células madre embrionarias representan una herramienta importante para la investigación y, en principio, un recurso potencial para la medicina regenerativa (Hori Y *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 2002, 99, 16105, Kim JH *et al.* Nature, 2002, 418, 50 Lanza RP *et al.*, Nat Med, 1999, 5, 975). Las células ES murinas (ESm), derivadas de masa celular interna pluripotente, pueden desarrollarse en ausencia de células suministradoras en medios complementados

con suero y FIL. La capacidad de FIL para mantener la pluripotencia celular de ESm, requiere la activación de la ruta de señalización STAT3. Sin embargo, FIL no mantiene el estado no diferenciado de las células ESh a pesar del hecho de que activa la ruta de señalización STAT3 (Humphrey R y Beattie G Stem Cells 2004, Daheron L y Opitz S Stem Cells 2004).

5

Como se muestra en detalle en los Ejemplos, la dependencia de la dosis de IQ-1 mantenía la proliferación celular y pluripotencia de ES, IQ-1 podía mantener la proliferación celular de ES en ausencia de suero si los medios se complementaban con Wnt3a. Es importante destacar que Wnt3a más IQ-1 era suficiente para mantener la proliferación celular y pluripotencia de ES durante periodos de tiempo prolongados en cultivo (al menos durante 48 días). Wnt3a más IQ-1 aumentaba la expresión de Oct4 y Sox2 y disminuía la expresión de c-myc en células de carcinoma embrionario P19. Recientemente, Boyer *et al.* (Cell 122, 947, 2005) han demostrado que Oct4 y Sox2 co-ocupaban los promotores/potenciadores de una parte sustancial de los genes requeridos para el mantenimiento de células ES humanas. Adicionalmente, c-myc parece tener un papel crítico en el equilibrio entre la auto-renovación de las células madre y la diferenciación y el aumento tras la diferenciación (Wilson A *et al* Genes Dev 18, 2747, 2004).

15

La señalización canónica o de Wnt/ $\beta$ -catenina desempeña un papel crucial en la regulación de la expansión de poblaciones de células madre tanto humanas como de ratón (Kleber M y Sommer L Current Op Cell Bio 2004, Willert K y Brown J Nature 2003, y Sato N y Meijer L Nat. Med 2004). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que las Wnt pueden actuar como un factor de crecimiento que mantiene la pluripotencia o como alternativa inducir la diferenciación e influir en las decisiones del linaje celular (Kleber y Sommer 2004, Hie F y Sommer L Cell Mol Life Sci 2005, Murashov A, Pak E Faseb J 2004, Feng Z y Srivastava A BBRC 2004).

20

Recientemente, los inventores han desarrollado un modelo para explicar esta señalización divergente de las actividades de Wnt/ $\beta$ -catenina (Figura 5). Este modelo resalta los diferentes papeles de los coactivadores CBP y p300 en la señalización de la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina (Emami *et al* 2004, Ma *et al* 2005, Teo *et al* 2005, McMillan y Kahn 2005). La característica crítica del modelo es que la transcripción mediada por FCT/ $\beta$ -catenina/CBP es crítica para la proliferación celular de células madre/progenitoras, mientras que un cambio a la transcripción mediada por FCT/ $\beta$ -catenina/p300, inducida o no quimiogénicamente con ICG-001 o endógenamente, es crítica para iniciar un programa de diferenciación con una capacidad proliferativa más limitada. Basándose en este modelo, se realizaron experimentos para determinar si IQ-1 afectaba al uso del coactivador CBP selectivo en la señalización de la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina.

25

30

IQ-1 promovía selectivamente la interacción  $\beta$ -catenina/CBP a costa de la correspondiente interacción p300/ $\beta$ -catenina. Usando un enfoque de cromatografía de afinidad, se muestra en el presente documento que las dianas moleculares de IQ-1 son las subunidades reguladoras empalmadas diferencialmente PR72/PR130 de la proteína fosfatasa PP2A (Bernards R 2004 y publicado). Bernards ha demostrado previamente que PR72 interactuaba con la proteína Nkd, un antagonista de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina inducible por Wnt, y que la pérdida de cualquiera de PR72 o Nkd daba como resultado la activación de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina. IQ-1 tenía efectos drásticos sobre el desarrollo embrionario de pez cebra y la extensión convergente. Identificando PR72/130 como dianas moleculares de IQ-1, la invención proporciona un ensayo para identificar otros agentes útiles para promover y/o mantener la proliferación de las células madre.

35

40

La capacidad para expandir poblaciones “madre/progenitora” en condiciones de crecimiento definidas tiene importantes ramificaciones en el área de la medicina regenerativa (Hori Y *et al* Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 2002, 99, 16105, Kim JH *et al.* Nature, 2002, 418, 50 Lanza RP *et al.* Nat Med, 1999, 5, 975). La señalización de la ruta de Wnt desempeña claramente un importante papel en la expansión de poblaciones “madre/progenitora” (Reya T *et al.* Nature, 2005,434, 843). Sin embargo, la señalización de Wnt también es crítica en los procedimientos de diferenciación y desarrollo de células, tejidos y órganos. Estos comportamientos de señalización divergentes de Wnt se controlan aparentemente mediante el uso selectivo de las proteínas coactivadoras CBP o p300 (Ma *et al.*, Teo *et al.* y McMillan y Kahn 2005). La elección endógena del uso del coactivador parece estar controlada por una serie compleja de modificaciones post-traduccionales diferenciales.

45

50

Farmacológicamente, el inventor había mostrado previamente la selección directa del coactivador bloqueando la interacción CBP/ $\beta$ -catenina con ICG-001, forzando de esta manera un cambio a la interacción p300/catenina, que tiene efectos divergentes del promotor específico (Ma *et al.*). Los resultados de la presente invención demuestran que IQ-1, mediante la modulación de las modificaciones post-traduccionales y la interacción con los componentes de la retroalimentación inhibitoria de Wnt/ $\beta$ -catenina, puede manipular también la selección de Wnt/coactivador de  $\beta$ -catenina. Potenciar la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina/CBP y evitar el cambio al uso de Wnt/ $\beta$ -catenina/p300 mediante IQ-1 permite la expansión a largo plazo de células ES mientras se mantiene la pluripotencia en medios definidos sin FEM o suero. La proliferación controlada de células “madre/progenitoras” para la producción de los materiales de partida requeridos para la medicina regenerativa es una aplicación importante.

55

60

Los compuestos adicionales útiles para la realización práctica de los procedimientos descritos y reivindicados en el presente documento incluyen los compuestos descritos y mostrados en la publicación de patente japonesa JP2006/180763A2, presentada el 27 de diciembre de 2004. Los compuestos de la publicación de patente incluyen aquellos designados como compuestos con las estructuras como las descritas en el documento JP2006/180763A2; los ejemplos se muestran a continuación.

65

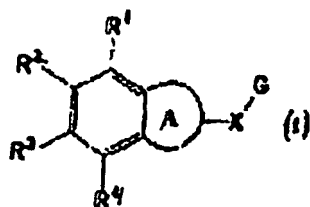
# ES 2 332 822 T3

Los compuestos incluyen los siguientes, designados a continuación como números de fórmula (compuesto).

5

## Formula 1

10



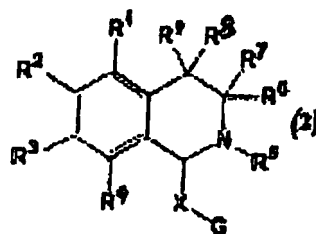
15

20 en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> pueden ser iguales o diferentes; y representan un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno. El anillo A indica un anillo de 5 a 8 miembros que contiene dentro del anillo al menos un heteroátomo. X indica un grupo alquileo con de 0 a 10 átomos en la cadena principal. Un grupo alquileo con 0 átomos indica un enlace sencillo. El etileno configurado por al menos uno de dichos grupos alquileo puede estar sustituido con un grupo - C = C - y/o un grupo - N = N - y/o un grupo - CONH -. Además, puede ser un grupo doble enlace que se une con el anillo A. Además, el grupo alquileo puede tener al menos un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno como un grupo de sustitución. G es un grupo aromático que puede tener un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un grupo hidrógeno. Dicho anillo A puede tener al menos un grupo atractor de electrones y/o un grupo donador de electrones como un grupo de sustitución en lugar de un grupo -XG.

30

## Formula 2

35



40

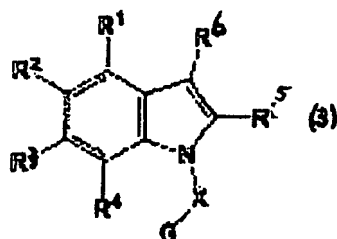
45

50 en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, X y G son iguales que los definidos en el Compuesto 1 anterior. R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> pueden ser iguales o pueden ser diferentes e indican un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno.

55

## Formula 3

60



65

# ES 2 332 822 T3

en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, X y G son iguales que los definidos en el Compuesto 1 anterior. R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> pueden ser iguales o diferentes e indican un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno.

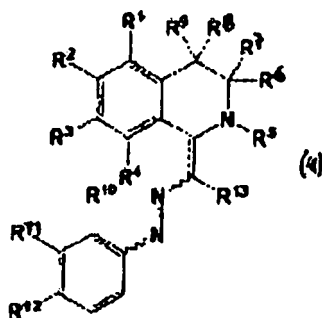
5

## Formula 4

10

15

20



25

30

en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son iguales a los definidos anteriormente. R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> pueden ser iguales o diferentes y representan un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno. La línea discontinua de lado doble y sencillo indica un enlace sencillo o un doble enlace. Cuando la línea discontinua de lado doble y sencillo indica un doble enlace, está presente un isómero geométrico para la parte de la línea ondulada. No hay restricciones particulares sobre dónde se disponen estos isómeros geométricos y pueden ser independientes entre sí, o pueden ser entidades E o entidades Z.

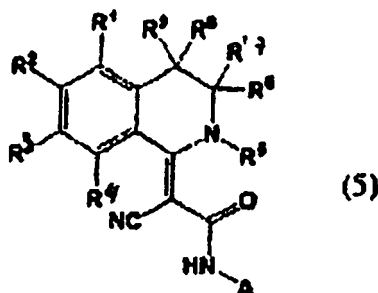
35

## Formula 5

40

45

50

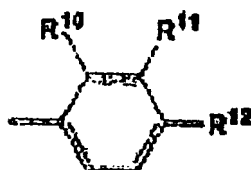


en la que A puede ser un átomo de hidrógeno o la Fórmula 6:

55

60

65



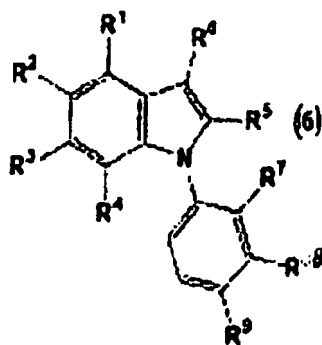
## ES 2 332 822 T3

en la que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^9$  son iguales a los definidos anteriormente.  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  pueden ser iguales o diferentes e indican un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno.

5

### Formula 7

10



15

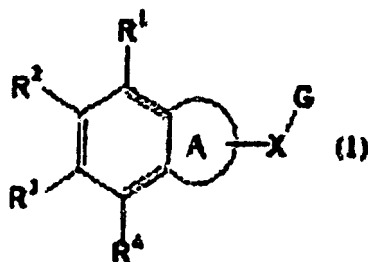
20

en la que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son iguales a los definidos anteriormente.  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^9$  pueden ser iguales o diferentes e indican un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno.

25

### Formula 8

30



35

40

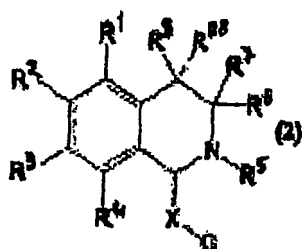
en la que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  pueden ser iguales o diferentes y representan un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno. Por "un grupo donador de electrones" se entiende un grupo de sustitución que puede donar electrones a un anillo de benceno; por "grupo atractor de electrones" se entiende un grupo de sustitución que tiene la capacidad de atraer electrones sobre un anillo de benceno. Además, el grupo donador de electrones se define como  $\sigma < 0$  y el grupo atractor de electrones se define como  $\sigma > 0$  usando la constante del grupo de sustitución de Hammett  $\sigma$ . (Fundamental Organic Reaction Theory, Hashimoto Yasunobu, *et al.*, Sankyo Publishing, 1997).

50

### Formula 9

55

60



65

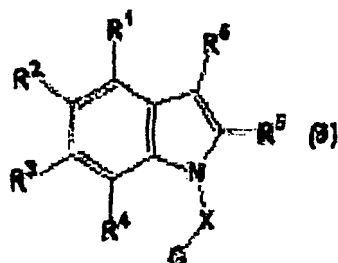
en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y X y G se definen como en el caso anterior. R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> pueden ser iguales o diferentes e indican un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno.

5

Formula 10

10

15



20

en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y X y G se definen como en el caso anterior, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> pueden ser iguales o diferentes y representan un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno.

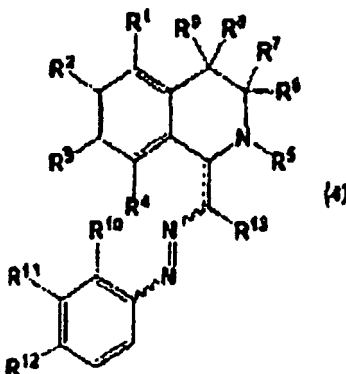
25

Formula 11

30

35

40

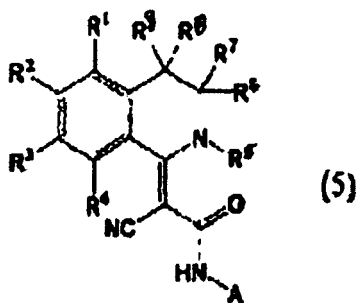


45

Formula 12

50

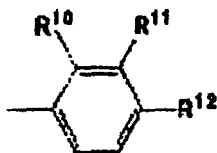
55



60

en la que A es un átomo de hidrógeno o la Fórmula 13:

65



## ES 2 332 822 T3

Para las Fórmulas 11 y 12, R<sup>1</sup> a R<sup>13</sup> pueden ser iguales o diferentes y representan un grupo atractor de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno. Los ejemplos específicos incluyen:

- 5 2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 2-(3-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 2-(4-bromo-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 10 2-(3-bromo-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 2-(4-clor-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 15 2-(3-clor-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-m-tolil azo-acetamida
- 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-p-tolil azo-acetamida
- 20 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(4-metoxi-fenil azo)-acetamida
- 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(3-metoxi-fenil azo)-acetamida
- 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(4-nitro-fenil azo)-acetamida
- 25 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(3-nitro-fenil azo)-acetamida
- 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(4-sulfamoil-fenil azo)-acetamida
- 30 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(3-sulfamoil-fenil azo)-acetamida
- 2-(4-acetil-amino-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 2-(3-acetil-amino-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 35 2-(2-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-fenil azo-acetamida
- 40 éster de (4-acetil-fenil azo)-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetato de etilo
- 2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-1-il)-acetamida
- 2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-metil-acetamida
- 45 2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-fenil-acetamida
- 2-(4-acetil-fenil azo)-2-(2,3,3-trimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida
- 50 (4-acetil-fenil azo)-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetonitrilo
- 2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N,N-dimetil-acetamida
- (4-acetil-fenil azo)-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetato
- 55 2-(2-acetil-3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(4-acetil-fenil azo)-acetamida
- 2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-p-tolil-acetamida
- 60 2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-m-tolil-acetamida
- 2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-o-tolil-acetamida
- 2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-(4-metoxi-fenil)-acetamida
- 65 2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-(3-metoxi-fenil)-acetamida
- 2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-(4-nitro-fenil)-acetamida

## ES 2 332 822 T3

2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-(3-nitro-fenil)-acetamida

éster de benzoato de 4-[2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden-acetil amino]-etilo

5 éster de benzoato de 3-[2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetil amino]-etilo

2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-fenil-acetamida

2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-(2,4-dimetilfenil)-acetamida

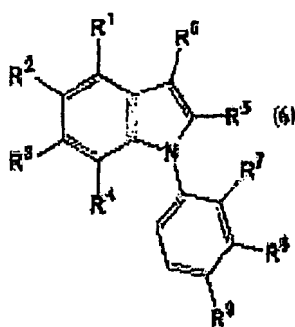
10

2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida

### Formula 15

15

20



25

30

en la que R<sup>1</sup> a R<sup>9</sup> son grupos atractores de electrones, un grupo donador de electrones o un átomo de hidrógeno que pueden ser iguales o diferentes. De estos, R<sup>1</sup> a R<sup>9</sup> deberían ser un grupo o un átomo seleccionado entre un grupo constituido por un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo hidroxilo, un grupo nitro, un grupo nitrilo, un grupo acetoxi, un grupo acetoxi alquilo, un grupo amino alquil alquilo cíclico que puede incluir un átomo de oxígeno, un grupo aminoalquil dialquilo, un grupo amino vinil dialquilo, un grupo amino alquil hidroxil alquilo, un grupo aminovinil arilo, un grupo alcoxi carbonilo, un átomo de halógeno y un átomo de hidrógeno. Además, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> deberían ser un átomo de hidrógeno; R<sup>3</sup> debería ser un grupo hidroxil o un grupo acetoxil; R<sup>4</sup> debería ser un grupo acetoxil alquilo, un grupo aminoalquil alquilo cíclico que puede contener un átomo de oxígeno, un grupo amino alquilo inferior dialquilo inferior, un grupo amino alquilo inferior hidroxil alquilo inferior o un átomo de hidrógeno;

35

40

R<sup>5</sup> debería ser un grupo alquilo inferior, un grupo amino vinil di-alquilo inferior o un grupo amino vinil arilo; R<sup>6</sup> debería ser un grupo nitro; R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> deberían ser un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior o un átomo de hidrógeno que pueden ser iguales o diferentes.

45

Los ejemplos específicos de los compuesto incluyen:

2-metil-3-nitro-1-fenil-1H-indol-6-ol

50

1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

2-metil-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol

55

2-[2-(4-metoxi-fenilo amino)-vinil] -3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol

1-(2-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

7-dimetil amino metil-2-(2-dimetil amino-vinil)-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol

60

clorhidrato de 1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-7-piperidin-1-il metil-1H-indol-6-ol

2-(2-dimetil amino-vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-7-morfolina-4-il metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

65

clorhidrato de 7-[(3-hidroxi-propil amino)-metil]-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

7-dimetil amino metil-2-(2-dimetil amino vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-1H-indol-6-ol

## ES 2 332 822 T3

- 7-dietil amino metil-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol
- 7-dimetil amino metil-2-metil-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol
- 5 1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-7-piperidin-1-il metil-1H-indol-6-ol acetato 7-acetoxi metil-2-metil-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-il éster
- 2-(2-dimetil amino vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-7-piperidin-1-il metil-1H-indol-6-ol
- 10 7-dimetil amino metil-2-metil-3-nitro-1-fenil-1H-indol-6-ol
- acetato de 7-dimetil amino metil-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol
- éster metílico de 6-acetoxi-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-7-ilo
- 15 2-(2-dimetil amino-vinil)-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol
- 2-(2-dimetil amino-vinil)-3-nitro-1-fenil-1H-indol-6-ol
- 20 éster metílico de acetato de 6-acetoxi-2-(2-dimetil amino-vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-1H-indol-7-ilo
- 1-(4-clor-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol
- éster metílico de acetato de 2-(2-dimetil amino-vinil)-6-hidroxi-1-(4-metoxil-fenil)-3-nitro-1H-indol-7-ilo
- 25 éster de carbonato de 5-hidroxi-2-metil-4,6-dinitro-1-fenil-1H-indol-3-etilo
- 7-[[bis-(2-hidroxi-etil)-amino]-metil]-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol
- 30 7-[[bis-(2-hidroxi-etil)-amino]-metil]-2-metil-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol
- 7-dimetil amino metil-2-(2-dimetil amino-vinil)-3-nitro-1-fenil-1H-indol-6-ol
- 2-(6-hidroxi-3-nitro-1-fenil-1H-indol-2-il metil)-isotio urea
- 35 éster de acetato de 2-(N,N'-difenil-carbamimida il sulfanil metil)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-1H-indol-6-ilo
- éster metílico de acetato de 6-acetoxi-1-(4-acetoxi-fenil)-2-(dimetil amino-vinil)-3-nitro-1H-indol-7-ilo
- 40 2-(2-dimetil amino-5-hidroxi-benzofuran-3-il)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-1H-indol-6-ol
- 2-(2-dimetil amino-vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-1H-indol-6-ol
- 5-bromo-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol
- 45 acetato de 1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol
- 7-dimetil amino metil-6-hidroxi-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 50 7-dietil amino metil-6-hidroxi-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 2-(2-dimetil amino-5-hidroxi-benzofuran-3-il)-6-metoxi-1-fenil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 6-metoxi-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 55 2-(2-dimetil amino-vinil)-6-metoxi-1-fenil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 5-bromo-6-hidroxi-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 60 5,7-dibromo-6-hidroxi-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 6-hidroxi-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 6-hidroxi-2-metil-1-p-tolil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 65 6-hidroxi-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-carbonitrilo
- 1H-furo [2,3-g] indol-3-acetato, 5-hidroxi-1-(4-metoxi fenil)-2,8-dimetilo, éster etílico

## ES 2 332 822 T3

- éster de acetato de 5-bromo-7-dimetil aminometil-6-hidroxi-1-fenil-2-fenilo sulfanil metil-1H-indol-3-etilo  
6-hidroxi-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-acetato
- 5 éster de acetato de 5-bromo-6-hidroxi-1-fenil-2-fenilo sulfanil metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-acetoxi-5-bromo-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 5-bromo-7-dimetil amino metil-6-hidroxi-1-fenil-2-fenilo sulfanil metil-1H-indol-3-etilo.
- 10 éster de acetato de 6-acetoxi-5-bromo-2-bromometil-1-fenil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-acetoxi-2-bromo metil-1-fenil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-acetoxi-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-etilo
- 15 pirrolo [2,3-f] [1,3] benzoxadin-3-acetato, 8-etil-1,7,8,9-tetrahidro-2-metil-1-(4-nitrofenil)-, éster etílico  
éster de acetato de 6-acetoxi-2-metil-1-(2-trifluorometil-fenil)-1H-indol-3-etilo
- 20 éster de acetato de 1-(2,4-dimetoxi-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-hidroxi-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 1-(4-etoxi carbonil-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo
- 25 éster de acetato de 1-(4-ciano-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-hidroxi-2-metil-1-(2-trifluoro metil-fenil)-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-hidroxi-2-metil-1-(4-trifluoro metil-fenil)-1H-indol-3-etilo
- 30 éster de acetato de 6-hidroxi-2-metil-1-(4-nitro-fenil)-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 1-(4-bromo-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo
- 35 éster de acetato de 1-(4-fluoro-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-hidroxi-2-metil-1-(4-nitro-fenil)-5,7-bis-piperidin-1-il metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 5,7-bis-dimetil amino metil-6-hidroxi-2-metil-1-(4-nitro-fenil)-1H-indol-3-etilo
- 40 éster de acetato de 6-hidroxi-2-metil-1-(4-nitro-fenil)-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-acetoxi-1-(4-clor-fenil)-2-metil-1H-indol-3-etilo
- 45 éster de acetato de 7-dimetil amino metil-6-hidroxi-2-metil-1-(4-nitro-fenil)-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 7-dimetil amino metil-6-hidroxi-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-hidroxi-2-metil-1-p-tolil-1H-indol-3-etilo
- 50 éster de acetato de 6-hidroxi-2-metil-1-fenil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 1-(4-clor-fenil)-7-dimetil amino metil-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo
- 55 éster de acetato de 1-(4-dimetil amino-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 1-(2-clor-fenil)-6-metoxi-2-metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 1-(2-clor-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo
- 60 éster de acetato de 6-acetoxi-1-(4-clor-fenil)-2-metil-5,7-dinitro-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 1-(4-clor-fenil)-6-hidroxi-2-metoxi-2-metil-5,7-dinitro-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-acetoxi-5,7-dibromo-1-(4-clor-fenil)-2-metil-1H-indol-3-etilo
- 65 éster de acetato de 5,7-dibromo-1-(4-clor-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo  
éster de acetato de 6-acetoxi-5-bromo-1-(4-clor-fenil)-2-metil-1H-indol-3-etilo

## ES 2 332 822 T3

éster de acetato de 5-bromo-1-(4-clor-fenil)-6-metoxi-2-metil-1H-indol-3-etilo

1-(4-clor-fenil)-6-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acetato

5 éster de acetato de 1-(4-clor-fenil)-6-metoxi-2-metil-1H-indol-3-etilo

éster de acetato de 1-(4-clor-fenil)-6-hidroxi-2-metil-1H-indol-3-etilo.

10 Los ejemplos del grupo alquilo inferior representado por R son los siguientes: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, 1-metil propilo, n-hexilo, isohexilo, 1,1-dimetil butilo, 2,2-dimetil butilo, 3,3-dimetil butilo, 3,3-dimetil propilo, 2-etil propilo y similares. Metilo es especialmente adecuado. Los ejemplos del grupo alcoxi inferior representado por R son los siguientes: metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, pentoxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi y similares. Metoxi es especialmente adecuado.

15 Los ejemplos del átomo de halógeno representado por R son los siguientes: flúor, cloro, bromo, yodo y similares aunque cloro o bromo son especialmente adecuados. Los ejemplos del grupo acilo inferior representado por R son los siguientes: formilo, acetilo, propionilo, butirilo y similares y acetilo es especialmente adecuado. Los ejemplos del grupo alquilo inferior que pueden formar la estructura cíclica representado por R son los siguientes: ciclobutilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo y similares. Ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo son especialmente adecuados.

20 Los ejemplos del alcoxi inferior carbonilo representado por R son los siguientes: metoxi carbonilo, etoxi carbonilo, propoxi carbonilo y similares, siendo metoxi carbonilo o etoxi carbonilo especialmente adecuados. Los ejemplos del amino carbonilo representado por R son los siguientes:  $-\text{CONR}_2$  (R es un átomo de hidrógeno que pueden ser iguales o diferentes; representa el grupo alquilo inferior ilustrado previamente, y un grupo fenilo que puede tener un grupo de sustitución).

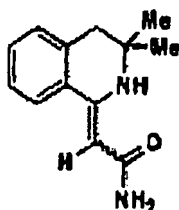
25 Los ejemplos del grupo aminocarbonilo secundario representado por R son  $-\text{CONHR}$  (R indica un grupo alquilo inferior ilustrado previamente y un grupo fenilo que puede tener un grupo de sustitución). Además, el grupo amino carbonilo terciario puede ser  $-\text{CONR}_2$  (R representa el grupo alquilo inferior que se ilustró previamente que pueden ser iguales o diferentes, y un grupo fenilo que puede tener un grupo de sustitución). Los ejemplos del grupo amino alquilo representado por R son:  $-(\text{CH}_2)_n -\text{NR}_2$  (donde n es un número entero de 1 a 8 y preferiblemente 1). R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo inferior, o un grupo alquilo inferior que puede formar una estructura cíclica que pueden ser iguales o diferentes (pueden incluirse de 1 a 3 heteroátomos de nitrógeno y oxígeno en la estructura cíclica), y un grupo fenilo que puede tener un grupo de sustitución) y similares.

30 Un ejemplo del acetoxi alquilo representado por R es:  $-(\text{CH}_2)_n -\text{Oac}$  (donde n es un número entero de 1 a 8) y n es preferiblemente 1.

40 Otros ejemplos específicos incluyen los compuestos de fórmulas 17-28 a continuación.

3,3-dimetil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinoliniden-1-acetamida (fórmula 17)

45

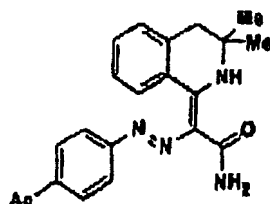


50

55

2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (fórmula 18)

60



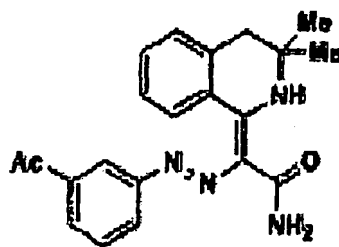
65

ES 2 332 822 T3

2-(3-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (fórmula 19)

5

10

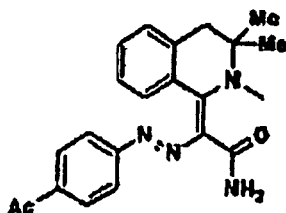


2-(4-acetil-fenil azo)-2-(2,3,3-trimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (fórmula 20)

15

20

25

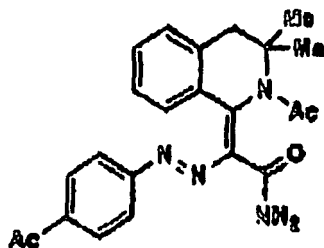


2-(2-acetil-3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(4-acetil-fenil azo)-acetamida (fórmula 21)

30

35

40

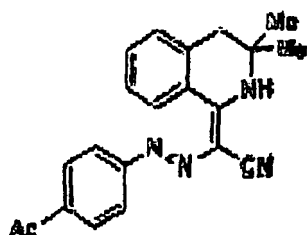


(4-acetil-fenil azo)-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetonitrilo (fórmula 22)

45

50

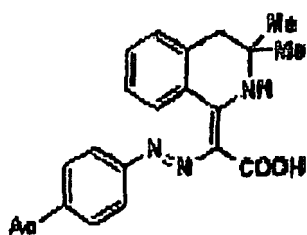
55



(4-acetil-fenil azo)-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetato (fórmula 23)

60

65

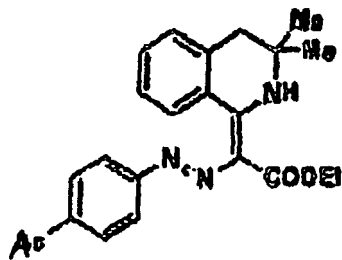


ES 2 332 822 T3

éster de acetato de (4-acetil-fenil azo)-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-etilo (fórmula 24)

5

10

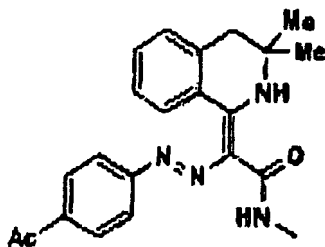


15

2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-metil-acetamida (fórmula 25)

20

25

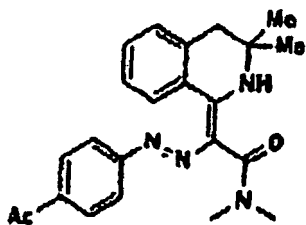


30

2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N,N-dimetil-acetamida (fórmula 26)

35

40



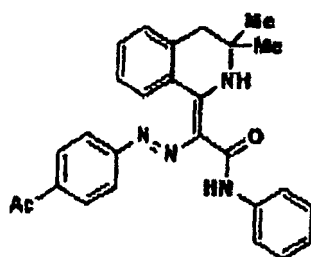
45

2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-fenil-acetamida (fórmula 27)

50

55

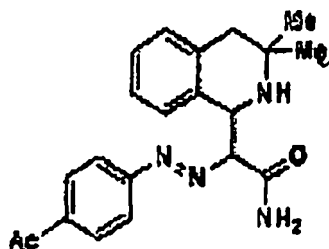
60



65

## ES 2 332 822 T3

2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-1-il)-acetamida (fórmula 28)



Otros ejemplos de compuestos incluyen:

2-ciano-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-N-p-tolil-acetamida

2-(4-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida

2-(3-clor-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida

2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(3-metoxi-fenil azo)-acetamida

2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(3-nitro-fenil azo)-acetamida

2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-(4-tolil-azo-fenil azo)-acetamida

2-(3-acetil-fenil azo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida

2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-2-en-tolil-azo-acetamida 2-metil-3-nitro-1-fenil-1H-indol-6-ol

1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol 2-metil-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol

2-[2-(4-metoxi-fenilo amino)-vinil]-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol 1-(2-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

7-dimetil amino metil-2-(2-dimetil amino-vinil)-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol

1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-7-piperidin-1-il metil-1H-indol-6-ol

2-(2-dimetil amino-vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-7-morfolina-4-il metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

7-[(3-hidroxi-propil amino)-metil]-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

7-dimetil amino metil-2-(2-dimetil amino-vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-1H-indol-6-ol

7-dimetil amino metil-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

7-dimetil amino metil-2-metil-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol

1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-7-piperidin-1-il metil-1H-indol-6-ol

éster de acetato 7-acetoxi metil-2-metil-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol

2-(2-dimetil amino-vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-7-piperidin-1-il metil-1H-indol-6-ol

7-dimetil amino metil -2-metil-3-nitro-1-fenil-1H-indol-6-ol

7-dimetil amino metil-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

éster metílico de acetato 6-acetoxi-1-(4-metoxi-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-7-ilo

2-(2-dimetil amino-vinil)-3-nitro-1-p-tolil-1H-indol-6-ol

## ES 2 332 822 T3

2-(2-dimetil amino-vinil)-3-nitro-1-fenil-1H-indol-6-ol

éster de acetato 6-acetoxi-2-(2-dimetil amino-vinil)-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-1H-indol-7-il metilo

5 1-(4-clor-fenil)-2-metil-3-nitro-1H-indol-6-ol

éster de acetato 2-(2-dimetil amino-vinil)-6-hidroxi-1-(4-metoxi-fenil)-3-nitro-1H-indol-7-il metilo

éster de carboxilato de 5-hidroxi-2-metil-4,6-dinitro-1-fenil-1H-indol-3-etilo.

10

Dichos compuestos pueden ensayarse como se describe en los Ejemplos en el presente documento para su adecuabilidad para la realización práctica de los procedimientos descritos en el presente documento.

15

Debe entenderse que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son sólo para propósitos ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos se les ocurrirán a las personas especialistas en la técnica.

### Ejemplos

20

Los siguientes ejemplos no se incluyen dentro del alcance de la invención actualmente reivindicada pero ayudan a entender la invención demostrando la actividad de un compuesto que puede identificarse usando el procedimiento de la invención.

#### *Procedimientos Experimentales usados en los Ejemplos 1-7*

25

*Cultivo celular.* Se mantuvieron ESC, D3ES (ATCC CRL-1934) en FEM tratados con mitomicina C en medio de ESC de ratón que contenía DMEM (Invitrogen) complementado con FBS al 15% (Invitrogen), aminoácidos no esenciales MEM 0,1 mM (Invitrogen), 2-mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma), L-glutamina 2 mM (Invitrogen) y 1.000 U/ml de FIL (CHEMICON). Para retirar los FEM, las células se recogieron por tripsinización y se colocaron en placas en platillos de cultivo recubiertos con gelatina durante 20 min. Las células no adherentes que consistían principalmente en ESC se volvieron a colocar en placas en platillos de cultivo recubiertos con gelatina de nuevo. Las células no adherentes se usaron para experimentos adicionales. Se cultivaron células P19 de acuerdo con las condiciones recomendadas por la ATCC. Las células se incubaron a 37°C en una incubadora al 5% de CO<sub>2</sub>. El Wnt3a purificado se adquirió (R&D Systems).

35

*Selección de Compuestos.* Para la selección de molécula pequeña, se determinó la actividad de fosfatasa alcalina de las ESC. Las ESC se colocaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de 316-1.000 células por pocillo en medio de ESC sin FIL. Los compuestos se añadieron a una concentración final de 4 µg/ml. Las células se trataron con compuestos durante 7 días y las poblaciones de células de ensayo se lavaron con PBS y se añadieron 100 µl de solución de fosfato de p-nitrofenilo (MOSS Inc.). La absorbancia a 405 nm se midió mediante un espectrofotómetro (Spectramax, Molecular Devices).

40

*Citometría de Flujo.* El análisis de la expresión de SSEA-1 de las ESC se realizó por citometría de flujo de acuerdo con Zandstra *et al.* (35). La población de células de ensayo se lavó en solución salina equilibrada de Hanks (Invitrogen) enfriada con hielo que contenía FCS al 2% (HF) y se resuspendió durante 10 min en HF que contenía anticuerpo monoclonal anti-ratón CD16/CD32 a 1 µg/100 µl (Phamingen) para bloquear la unión no específica. Las células bloqueadas se incubaron después a 1x10<sup>7</sup> células/ml durante 40 min en hielo con anti-SSEA-1 (Kyowa Medex) seguido de anticuerpo FITC-Cabra anti Ratón IgM (ZYMED). Las células a analizar para su expresión de SSEA-1 se lavaron entonces dos veces en HF, añadiendo 2 µg/ml de yoduro de propidio (Dojindo) en el lavado final. Las células se resuspendieron después en HF para su análisis en un FACS Calibur (Becton Dickinson).

50

Las células NIH-3T3 (wt), las células NIH-3T3 CBP (+/-) y las células NIH-3T3 p300 (+/-) se transfectaron como se describe en (26). En resumen, las células se transfectaron con TOPFLASH o FOPFLASH, usando Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals). Las eficacias de transfección se normalizaron con el plásmido de luciferasa pRL-nulo. Los ensayos con luciferasa se realizaron con el Sistema de Ensayo de Informador DUAL-Luciferasa (Promega).

55

*RT-PCR en Tiempo Real.* El ARN total se aisló y se transcribió en fase inversa usando Superscript III (Invitrogen). Se realizó RT-PCR en tiempo real (Sybr Green; BioRad) usando los cebadores específicos para genes:

60

*Nanog-F* agggctctgactgagatgctctg (SEC ID N°: 5)

*Nanog-R* caacctggttttctgccaccg (SEC ID N°: 6)

*GAPDH-F* ggtgaagctcgggtgaaacgga (SEC ID N°: 7)

65

*GAPDH-R* tggtagtggggtctcctctg (SEC ID N°: 8)

## ES 2 332 822 T3

En algunos experimentos, se transcribieron 2  $\mu\text{g}$  del ARN total extraído en fase inversa usando el sistema Superscript III RT-PCR (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se amplificó 1  $\mu\text{l}$  de ADNc por PCR con uno o más de los cebadores específicos para genes de las SEC ID N°: 5-18 usando ciclos de PCR optimizados para obtener reacciones amplificadas en el intervalo lineal.

5	Oct-3/4-F ggcgttctctttgaaaggtgttc	(SEC ID N°: 9)
	Oct-3/4-R ctcgaaccacatccttctct	(SEC ID N°: 10)
10	Rex-1-F gtcttatcgatgctggagt	(SEC ID N°: 11)
	Rex-1-R aaagctcttctcgagccat	(SEC ID N°: 12)
15	Sox-2-F gcatgtctactcgagcag	(SEC ID N°: 13)
	Sox-2-R gctgatcatgcccggaggt	(SEC ID N°: 14)
	C-Myc-F accaacagcaactatgacctc	(SEC ID N°: 15)
20	C-Myc-R aaggacgtagcgaccgcaac	(SEC ID N°: 16)
	MDR-1-F tgcttatggatcccagagtg	(SEC ID N°: 17)
25	MDR-1-R ttggtgaggatctctccgct	(SEC ID N°: 18)

25 *Transfección y ensayo con Luciferasa.* Se cultivaron ESC en platinos de cultivo celular de 96 pocillos recubiertas con una solución de gelatina acuosa al 0,1% y se transfectaron con 0,2  $\mu\text{g}$ /pocillo de pSTAT3-TA-Luc (CLONTECH), usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Después de 6 horas, las células se lavaron y se expusieron a IQ-1 a las dosis indicadas, o FIL, durante 24 horas. Las eficacias de transfección se normalizaron con el plásmido de luciferasa pRL-nulo. Los ensayos con luciferasa se realizaron con el Sistema de Ensayo Informador DUAL-Luciferasa (Promega).

30 En algunos experimentos, las células NIH-3T3 (wt), las células NIH-3T3 CBP (+/-) y las células NIH-3T3 p300 (+/-) se transfectaron como se describe en (26). En resumen, las células se transfectaron con TOPFLASH o FOP-FLASH, usando Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals). Las eficacias de transfección se normalizaron con plásmido de luciferasa pRL-nulo. Los ensayos con luciferasa se realizaron con el Sistema de Ensayo Informador DUAL-Luciferasa (Promega).

40 *Detección de CBP, p300, y fosfo-serina89-p300 en células P19.* Las células P19 se expusieron a Wnt3A o vehículo de control, después de lo cual se añadió IQ-1 a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . El DMSO de control era del 0,025%. Las células se incubaron durante 24 horas. Al final de este periodo de incubación, las células se lavaron, se lisaron y se sometieron a SDS-PAGE. Se detectaron CBP y p300 usando el anticuerpo policlonal de conejo (A-22) (1:5000); y (C-20) (1:5000) (Santa Cruz), respectivamente. Se detectó fosfo-serina89-p300 usando antisero habitual a una dilución de 1:100.

45 *Co-inmunoprecipitación de  $\beta$ -catenina con CBP o p300 en células P19.* La co-inmunoprecipitación se realizó como se describe en (27). En resumen, las células P19 se trataron con ICG-001 10  $\mu\text{M}$  o IQ-1 10  $\mu\text{M}$  (el DMSO de control era del 0,025%) durante 24 horas, después de lo cual se lavaron y lisaron usando. La fracción nuclear se aisló y preclaró con anticuerpos para CBP (A-22) o p300 (N-15). Se detectó la  $\beta$ -catenina usando un anticuerpo monoclonal de ratón (Becton Dickinson) a una dilución de 1:5000.

50 *Afinidad de p300 fosforilado *in vitro* con 3-catenina.* p300 recombinantes (1-110 aa) condensadas con un marcador HA se incubaron con PKC $\alpha$  en tampón quinasa (Hepes 20 mM, pH 7,4, acetato de magnesio 10 mM, ditiotreititol 1 mM, ATP 100  $\mu\text{M}$ ). La co-inmunoprecipitación se realizó en lisados de P19 mezclados con el p300 fosforilado *in vitro* usando un anticuerpo del marcador HA, se detectó p300 usando el anticuerpo policlonal de conejo (C20), 1:5000, se detectó 3-catenina usando un anticuerpo monoclonal de ratón (Becton Dickinson) a una dilución de 1:5000.

60 *Purificación por Afinidad de Proteínas Diana.* Se cultivaron células P19 a una confluencia del 90-100%. Las células se lisaron en tampón de unión a proteína [PBB, Hepes 20 mM, pH 7,9/NaCl 100 mM/EDTA 0,5 mM/Nonidet P-40 al 0,5%/MgCl<sub>2</sub> 6 mM/2-mercaptoetanol 5 mM/un comprimido de inhibidor de proteasa completo (Roche Molecular Biochemicals)]. Se unió IQ-1 biotinilado durante una noche a temperatura ambiente a una suspensión al 50% de perlas de estreptavidina-agarosa (Amersham Pharmacia) en tampón que contenía DMSO al 50% y PBB al 50%. Las perlas se lavaron para retirar IQ-1 no unido y después se incubaron con lisados celulares completos. Las proteínas que eluyeron por ebullición en SDS se tiñeron por Coomassie para detectar proteínas diana, o inmunotransferidas.

65 *Experimentos con pez cebra.* La cepa de pez cebra de tipo silvestre (AB) en la fase de 1-célula se trató con IQ-1 a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  en medio embrionario durante 24 h. Se incubaron embriones de pez cebra de

control a una concentración equivalente de DMSO. Al final de este tratamiento de 24 h, los embriones se declararon manualmente y se crearon imágenes. Los embriones de pez cebra se mantuvieron a 28°C. Los resultados mostrados son representativos de aquellos obtenidos de al menos 10 embriones para cada grupo, a partir de 2 experimentos independientes.

5 *Inmunocitoquímica y Anticuerpos.* Las células se fijaron durante 20 min con paraformaldehído al 4% en PBS. La inmunotinción se realizó usando protocolos convencionales. Se usaron anticuerpos primarios a las siguientes diluciones: monoclonal de ratón anti  $\alpha$ -fetoproteína (R&D sistemas, 10  $\mu$ g/ml), anti-Actina, monoclonal de ratón Ab-1 para músculo liso (LAB VISION, 1:1), monoclonal de ratón anti-GATA4 (SANTA CRUZ, 1:100), monoclonal de ratón anti-MAP(proteína asociada a microtúbulos)2 (Chemicon, 1:200), monoclonal de ratón  $\beta$ III-tubulina (Chemicon, 1:200), monoclonal de ratón anti-Oligodendrocito (Chemicon, 1:1,000). Los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 488 o 594 IgG de cabra anti-ratón (H+L) (Invitrogen, 1:200). Se crearon imágenes de las células usando un microscopio Olympus IX 70 con un aumento x 40-200.

## 15 Ejemplo 1

### *PR72/130 y proliferación de células ES*

20 La molécula pequeña IQ-1 (Asahi Kasei Pharma, Figura 1) aumentó selectivamente el uso de  $\beta$ -catenina de CBP como un coactivador a costa del uso de p300, manteniendo de esta manera las células embrionarias (ES) en un estado no diferenciado. La combinación de Wnt3a e IQ-1 permitió la proliferación y el mantenimiento de la pluripotencia como se juzga mediante la expresión de Oct4, *Nanog* y Rex1, mientras que IQ-1 solo no era suficiente para provocar la proliferación y mantener la pluripotencia de las células ES.

25 El presente ejemplo se refiere a la identificación de la diana molecular de IQ-1. Para identificar la diana molecular de IQ-1, lisados celulares completos de células de carcinoma embrionario P19 se trataron con IQ-1 biotinilada. Comparada con un compuesto biotinilado de control (Figura 3A, carril 2), la IQ-1 biotinilada se unió selectivamente a tres proteínas (Figura 3A, carril 3). Las dos bandas a 72 y 130 kDa se identificaron por secuenciación espectral de masa como las subunidades reguladoras PR72/130 empalmadas diferencialmente de la proteína fosfatasa serina/treonina, PP2A. Esto se confirmó posteriormente por inmunotransferencia (Figura 3B).

35 El hecho de que IQ-1 se una selectivamente a estas proteínas se correlaciona bien con los efectos observados sobre la modulación de la señalización de Wnt, ya que previamente se había demostrado que PR72/130 interacciona con la proteína cutícula desnuda, un componente de la ruta de señalización de Wnt, regulando de esta manera la señalización de Wnt (Creyghton, M. P. *et al.*, Genes and Dev 19:376-386 2005). Usando morfolinós en embriones de xenopus, se demostró también que PR72, como cutícula desnuda (Nkd), es un regulador negativo de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina y está implicado en el cambio a una extensión convergente no canónica (Creyghton *et al.*).

## 40 Ejemplo 2

### *IQ-1 mantenía el estado no diferenciado de las ESC*

45 Se seleccionaron ESC murinas (D3 ES) con una biblioteca química (Asahi Kasei) para identificar compuestos que potenciaran la producción de Fosfatasa Alcalina (FA), un marcador de las ESC no diferenciadas (12). A partir de esta selección, se identificó IQ-1 (PM = 362,42, Figura 1 A), cuya dosis aumentaba de forma dependiente la actividad de FA (Figura 1B), en medios que contenían FCS al 15% sin la adición de factor inhibidor de leucemia exógeno (FIL). El tratamiento con IQ-1 dio como resultado una expresión potenciada del marcador de ESC no diferenciado, Stage Specific Embryonic Antigen 1 (SSEA-1) de una manera dependiente de la dosis (Figura 1C).

55 IQ-1 permitía la expansión a largo plazo de las ESC en cultivo sin FEM y sin la adición de FIL exógeno. Se cultivaron ESC D3 de ratón en medios que contenían FCS al 15% más 4  $\mu$ g/ml de IQ-1 durante 65 días. Las ESC continuaron proliferando a una velocidad constante con un aumento aproximado de 2 log cada diez días (Figura 1D).

## Ejemplo 3

### *IQ-1 mantenía la auto-renovación de ESC murina independientemente del FIL*

60 La citoquina FIL, activando la ruta de transducción de señales Stat3, mantiene la auto-renovación simétrica de ESC murina y bloquea la diferenciación (13, 14, 15). FIL no mantenía la auto-renovación de ESC humana (16, 17). *Nanog* es un factor de mantenimiento de la pluripotencia de la homeoproteína divergente para las ESC (18, 19). Se ha demostrado que *Nanog* actúa en paralelo con la estimulación accionada por FIL de Stat3 para accionar la auto-renovación de ESC. Además, una elevada expresión de *Nanog* es suficiente para la expansión clonal de las ESC y el mantenimiento de expresión del factor de transcripción de la célula madre clave Oct4, en ausencia de activación de Stat3 (19).

Para investigar adicionalmente el mecanismo de acción de IQ-1, se determinaron los efectos de IQ-1 sobre la expresión de *Nanog*. Mientras las ESC sin suministrador tratadas con FIL sólo aumentaban ligeramente los niveles de *Nanog*, IQ-1 aumentó y mantuvo significativamente la expresión de *Nanog* en cultivo según se juzgó por RT-PCR en tiempo real (Figura 2A). La retirada de IQ-1 del cultivo condujo a la caída precipitada en el nivel de *Nanog* (Figura 2B). La pérdida de expresión de *Nanog* se había correlacionado previamente con la diferenciación de ESC (18, 19). Para confirmar adicionalmente que los efectos de IQ-1 no estaban mediados por la señalización de Stat3, se utilizó una construcción de Stat3/informador génico de luciferasa. Mientras IQ-1 elevaba significativamente la expresión de *Nanog*, no afectó a la expresión de Stat3/luciferasa a diferencia de FIL, que como se había anticipado, suscitó una respuesta significativa (Figura 2C). A partir de este Ejemplo, puede concluirse que los efectos de IQ-1 sobre el mantenimiento de la pluripotencia de ESC murina son independientes de la ruta de FIL/Stat3.

#### Ejemplo 4

##### 15 *IQ-1 modula la señalización de WNT por interacción con PR72/130*

Este ejemplo se realizó para examinar los efectos de IQ-1 sobre la señalización “no canónica” de Wnt examinando la extensión convergente durante el desarrollo de pez cebra (danio rerio). Los embriones de pez cebra tratados con IQ-1 1  $\mu$ M mostraron defectos de desarrollo significativos (Figura 3C). En particular se observó una cola acortada, consistente con la inhibición de la extensión convergente y similar a los efectos de morfolidos de PR72, (25). A partir de este Ejemplo y del Ejemplo 1, puede concluirse que la diana molecular de IQ-1 es PR72/130. La interacción de IQ-1 con PR72/130 da como resultado la alteración del complejo PR72/130/Nkd, e inhibe la regulación “negativa” de la señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina y un cambio concurrente a una extensión convergente “no canónica”.

25

#### Ejemplo 5

##### *El mantenimiento mediante IQ-1 de las ESC depende de WNT/ $\beta$ -catenina/CBP*

Se ha demostrado que la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina inhibe la diferenciación neuronal y mantiene la pluripotencia en células madre (1-3) y es crítica para la expansión de progenitores (4). Sin embargo, la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina se requiere también para la diferenciación neural de las ESC y las células madre neurales (5-6). Usando ICG-001, un antagonista específico recién caracterizado de la interacción  $\beta$ -catenina/CBP, se desarrolló un modelo para explicar las actividades divergentes de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina (7, 8, 26, 27). La característica clave de este modelo es que la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina/CBP es crítica para la proliferación de células “madre/progenitoras”, mientras que un cambio hacia la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina/p300 es crítica para iniciar un programa de diferenciación con una capacidad proliferativa más limitada.

Las construcciones informadoras de Wnt/ $\beta$ -catenina TOPFLASH y FOPFLASH en células NIH-3T3 de tipo silvestre (wt), células NIH-3T3 CBP (+/-) y células NIH-3T3 p300 (+/-) se usaron para determinar si IQ-1, dirigiendo la subunidad PR72/130 con PP2A, estaba aumentando selectivamente el uso de  $\beta$ -catenina de CBP como un coactivador a costa de p300, manteniendo de esta manera las ESC en el estado no diferenciado (Figura 4A). Se usó un mutante puntual que transloca constitutivamente  $\beta$ -catenina (pt-mut wt-cat) para estimular la actividad informadora (28). Aunque IQ-1 no afecta a la actividad de TOPFLASH o FOPFLASH en cualquiera de las células wt o CBP (+/-), se observó un aumento de 2-3 veces en la actividad de TOPFLASH en las células p300 (+/-) (Figura 6). Esto sugiere que los efectos de IQ-1 son específicos para el coactivador y dependen del nivel de expresión de p300.

Para evaluar directamente los efectos de IQ-1 sobre el uso del coactivador de  $\beta$ -catenina, se realizó la co-immunoprecipitación con anticuerpos para cualquiera de CBP o p300, seguido de inmunotransferencia para  $\beta$ -catenina asociada con el coactivador utilizando células de carcinoma embrionario P19 tratadas con Wnt3a en presencia o ausencia de IQ-1. IQ-1 provocaba un aumento drástico en la cantidad relativa de  $\beta$ -catenina asociada con CBP comparado con las células tratadas con Wnt3a y cualquiera de DMSO o el antagonista de CBP/ $\beta$ -catenina ICG-001, ICG-001, que induce la diferenciación celular (7), potenciando significativamente la interacción p300/ $\beta$ -catenina a costa de la interacción CBP/ $\beta$ -catenina (Figura 4B).

55

#### Ejemplo 6

##### *IQ-1 reduce indirectamente la fosforilación de SER89 de P300 y, de esta manera, la interacción $\beta$ -catenina/P300*

60

Se sabe que la señalización mediante la ruta Wnt “no canónica” puede aumentar la actividad de PKC (29) y que Ser89 de p300 pueden fosforilarse de una manera dependiente de PKC (30). El presente ejemplo se realizó para evaluar los efectos de la fosforilación con PKC $\alpha$  de Ser89 de p300 sobre la unión de p300 a  $\beta$ -catenina. Se fosforiló p300 recombinante (1-110aa) con PKC $\alpha$  purificado. El p300 fosforilado *in vitro* se añadió después a lisados celulares de células P19 y los complejos  $\beta$ -catenina/p300 se co-immunoprecipitaron. Antes de la fosforilación con PKC $\alpha$  se potenció la interacción p300/ $\beta$ -catenina (Figura 4C, compárese el carril 2 con el carril 1), para determinar si la interacción potenciada era dependiente de la fosforilación de Ser89 de p300 mediante PKC $\alpha$ , habiendo mutado el resto serina a alanina en el fragmento de p300 recombinante. La mutagénesis de Ser89 a Ala89 abrogaba por el aumento dependiente

65

## ES 2 332 822 T3

de PKC $\alpha$  en la unión a  $\beta$ -catenina (Figura 4C, compárese la diferencia entre los carriles 3 y 4 a carriles 1 y 2). Esto indica que la fosforilación de Ser89 de p300 potencia la afinidad de la interacción  $\beta$ -catenina/p300.

Para determinar la relevancia fisiológica de este mecanismo dependiente de fosforilación para aumentar la interacción  $\beta$ -catenina/p300 en las células, se expusieron células P19 a Wnt3a purificado y se trataron con IQ-1 o con DMSO como control. Según se juzgó por inmunotransferencia, el tratamiento con IQ-1 de Wnt3a estimuló las células P19 provocando una disminución drástica en el nivel de fosforilación de Ser89 de p300 (Figura 4D Superior, compárese los carriles 2 y 3) mientras que la cantidad total de p300 no se vio afectada por IQ-1 (Figura 4D Centro, compárese los carriles 2 y 3). Basándose en estos resultados, puede concluirse que IQ-1 regulando negativamente la fosforilación de Ser89 de p300 disminuye así la afinidad de la interacción  $\beta$ -catenina/p300 y aumenta el uso de  $\beta$ -catenina/CBP.

### Ejemplo 7

#### 15 *Mantenimiento a largo plazo de ESC en medios sin suero que contienen IQ-1 y WNT3A*

RT-PCR en tiempo real de células P19 tratadas con Wnt3a y IQ-1 reveló un aumento de la expresión de marcadores “madre/progenitor” incluyendo *Oct4*, *Sox2* (31) y *MDR-1* (32) y una disminución en la expresión de *c-myc* (33) comparado con células tratadas con Wnt3a + DMSO (Tabla 1). La adición de Wnt3a purificado (100 ng/ml) a KSR al 15% (medio de sustitución del suero) junto con 4  $\mu$ g/ml de IQ-1 fue suficiente para aumentar los niveles de fosfatasa alcalina y mantener la pluripotencia de ESC a largo plazo (48 días), similar a los resultados obtenidos con IQ-1 y FCS al 15% (Figura 7). Ni Wnt3a ni IQ-1 en solitario eran suficientes para mantener el estado no diferenciado de las ESC en medios de KSR (Figura 8). Wnt3a solo indujo proliferación, pero no era suficiente para mantener la expresión de los marcadores de las células madre *Oct4*, *Nanog* o *Rex1*. Sin embargo, la combinación de Wnt3a y IQ-1 permitió la proliferación y mantenimiento de la pluripotencia según se juzga mediante la expresión de *Oct4*, *Nanog* y *Rex1* (Figura 9A, B, y C). El tratamiento de las ESC con IQ-1 y Wnt3a mantuvo la pluripotencia de las ESC según se juzgó por su capacidad para formar cuerpos embrioides después del día 48 (Figura 5A, panel izquierdo) y la capacidad para diferenciar los tres tejidos derivados de la capa germinal (Figura 5B). La retirada de IQ-1 condujo a una rápida pérdida (en 3 días) de pluripotencia y la incapacidad de formar cuerpos embrioides (Figura 5A, panel derecho). Basándose en este ejemplo, puede concluirse que IQ-1 aumentando la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina/dependiente de CBP y evitando el cambio a transcripción mediada por Wnt/ $\beta$ -catenina/p300 era suficiente para mantener la pluripotencia murina de ESC a largo plazo.

TABLA 1

	$\Delta\Delta$ CTIQ-1
Sox-2	4,31
MDR-1	1,69
Oct4	0,39
c-myc	-2,01

En la Tabla 1, anterior, se muestran los efectos del tratamiento con IQ-1 sobre genes asociados con el mantenimiento de la célula madre, según se miden por RT-PCR. Los valores se representan como  $\Delta\Delta$ CT del gen de control  $\beta$ -actina.

Estos Ejemplos demuestran que IQ-1 junto con Wnt3a purificado es suficiente para mantener la proliferación y pluripotencia murina de ESC durante periodos de tiempo prolongados en cultivo (al menos 48 días) en ausencia de suero. IQ-1 más Wnt3a regulaba positivamente la expresión de los factores de transcripción *Oct4* y *Sox2*, que son críticos para el mantenimiento de las ESC. Recientemente, Boyer *et al.* demostraron que *Oct4* y *Sox2* co-ocupaban los promotores/potenciadores de una parte sustancial de los genes requeridos para el mantenimiento de ESC humanas (31). Como se muestra en los Ejemplos, IQ-1 regula negativamente la expresión de *c-myc*. *C-myc* parece tener un papel crítico en el equilibrio entre la auto-renovación y la diferenciación de las células madre y aumenta tras la diferenciación (33).

Usando en enfoque de cromatografía de afinidad, se determinó que las diana o dianas moleculares de IQ-1 son las subunidades reguladoras empalmadas diferencialmente PR72/PR130 de la proteína fosfatasa PP2A. Esto es extremadamente interesante porque PR72 interactúa con la proteína Nkd (25), un antagonista inducible por Wnt de la señalización “canónica” de Wnt/ $\beta$ -catenina (24). Similar a los resultados observados con morfolinós de PR72 (25), IQ-1 tenía efectos drásticos sobre la extensión convergente “no canónica” durante el desarrollo embrionario del pez cebra. La cuestión de los papeles de las dos variantes de empalme PR72 y PR130 en el cambio de señalización de wnt “canónica” a “no canónica” parece ser bastante compleja. Recientemente, Bernards *et al.* mostraron que, a diferencia

de PR72, PR130 puede antagonizar algunos de los efectos de Nkd en diversos ensayos. Sin embargo, morfollinos de PR130 afectaba al desarrollo somático y a la formación de la cola en embriones de xenopus (34). Por lo tanto, los efectos de IQ-1 sobre el desarrollo embrionario de pez cebra son consistentes con la inhibición potencial de ambas variantes de empalme. Sin ceñirse a un mecanismo particular, los resultados son consistentes con un modelo en el que la interacción de IQ-1 con PR72/130 da como resultado la alteración del complejo PR72/130 Nkd modulando así la señalización de Wnt. Los efectos morfológicos sobre el desarrollo del pez cebra son consistentes con un modelo en el que IQ-1 inhibe la regulación “negativa” de la señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina y un cambio concurrente a una extensión convergente “no canónica” (Fig. 5C).

La fosforilación *in vitro* de p300 recombinante mediante PKC, una enzima activada por la señalización “no canónica” de Wnt, aumentó la afinidad de la  $\beta$ -catenina por p300. Adicionalmente en células, IQ-1 disminuyó significativamente la fosforilación estimulada por Wnt de p300 en Ser89, sin afectar al nivel celular global de p300. El mecanismo mediante el que IQ-1 puede reducir el estado de fosforilación de p300 en Ser89 sigue sin estar claro y es el asunto de investigaciones en curso.

IQ-1 promovía selectivamente la interacción  $\beta$ -catenina/CBP a costa de la interacción correspondiente  $\beta$ -catenina/p300. IQ-1 potenciando la transcripción mediada por Wnt/ $\beta$ -catenina/CBP y evitando el cambio a la transcripción mediada por Wnt/ $\beta$ -catenina/p300 permite la expansión a largo plazo de ESC murinas mientras mantiene la pluripotencia sin FEM o suero.

El uso de un coactivador diferencial en la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina parece ser un regulador crítico en el mantenimiento del estado de la célula “madre/progenitora”, el inicio de la diferenciación con una capacidad proliferativa más restringida, así como el cambio de señalización “canónica” a “no canónica” de Wnt. Los efectos de IQ-1 sobre la pluripotencia mediada por Wnt están asociados con la inhibición de la regulación “negativa” de la señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina mediante el complejo Nkd/PR72/PP2A, aumentando de esta manera la transcripción accionada por  $\beta$ -catenina/CBP a costa de la transcripción accionada por  $\beta$ -catenina/p300.

La capacidad para expandir las poblaciones de “madre/progenitora” en condiciones de crecimiento definidas tiene importantes ramificaciones en el área de la medicina regenerativa, y los Ejemplos en el presente documento sostienen dicho uso.

## Referencias

- 1 Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, JR 3rd & Nusse, R. (2003) *Nature* 423, 448-452.
- 2 Haegeler, L., Ingold, B., Naumann, H., Tabatabai, G., Ledermann, B. & Brandner, S. (2003) *Mol. Cell Neurosci.* 24, 696-708.
- 3 Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. (2004) *Nat. Med.* 10, 55-63.
- 4 Chenn, A. & Walsh, C. A. (2002) *Science* 297, 365-369.
- 5 Otero, J. J., Fu, W., Kan, L., Cuadra, A. E. & Kessler, J. A. (2004) *Development* 131, 3545-3557(2004).
- 6 Muroyama, Y., Kondoh, H. & Takada, S. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 915-921.
- 7 Teo, J. L., Ma, H., Nguyen, C Lam, C. & Kahn, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 102, 12171-12176.
- 8 McMillan, M. & Kahn, M. (2005) *Drug Discov. Today* 10, 1467-1474.
- 9 Xu, C, Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., & Carpenter, M. (2001) *Nat. Biotech.* 19, 971-974.
- 10 Lu, J., Hou, R, Booth, C. J., Shih-Hung Yang, S y Snyder, M. (2006) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 103,5688-5693.
- 11 Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A. & Ding, S. (2006) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 103, 6907-6912.
- 12 Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D. & Williams, R L. (1990) *Dev. Biol.* 141, 344-352.
- 13 Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. & Rogers, D. (1988) *Nature* 336, 688-690.
- 14 Williams, R. L, Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L, Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. & Gough, N. M. (1988) *Nature* 336,684-687.

## ES 2 332 822 T3

15 Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998) *Genes Dev.* 12, 2048-2060.

16 Humphrey, R. K., Beattie, G. M., Lopez, A. D., Bucay, N., King, C. C., Firpo, M. T., Rose-John, S. & Hayek, A. (2004) *Stem Cells* 22, 522-530.

5 17 Daheron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, W. M., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J. & Daley, G. Q. (2004) *Stem Cells* 22, 770-778.

10 18 Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S. (2003) *Cell* 113, 631-642.

19 Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A. (2003) *Cell* 113, 643-655.

15 20 Mumby, M. C. & Waler, G. (1993) *Physiol. Rev.* 73, 673-699.

21 Hendrix, P., Mayer-Jackel, R E., Cron, P., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W., Hemmings, B. A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 15267-15276.

20 22 Seeling, J. M., Miller, J. R., Gilo, R., Moon, R. T., White, R. & Virshup, D. M. (1999) *Science* 283, 2089-2091.

23 Ratcliffe, M. J., Itoh, K. & Sokol, S. Y. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 35680-35683.

25 24 Zeng, W., Wharton, K. A. Jr, Mack, J. A., Wang, K., Gadbow, M., Suyama, K., Klein, P. S., Scott, M. P. (2000) *Nature* 403, 789-795.

25 25 Creighton, M. P., Roel, G., Eichhorn, P. J. A., Hijmans, E. M., Maurer, I., Destree, O. & Bernards, R. (2005) *Genes. Dev.* 19, 376-386.

30 26 Emami, K. H., Nguyen, C, Ma, H., Kim, D. H., Jeong, K. W., Eguchi, M., Moon, R. T., Teo, J. L, Kim, H. Y., Moon, S. H., et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101, 12682-12687.

27 Ma, H., Nguyen, C, Lee, K. S. & Kahn, M. (2005) *Oncogene* 24, 3619-3631.

35 28 Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Clevers, H. (1997) *Science* 275, 1784-1787.

29 Kohn, A. D. & Moon, R. T. (2005) *Cell Calcium* 38, 439-446.

40 30 Yuan, L. W. & Gambee, J. E. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 40946-40951.

31 Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G. et al. (2005) *Cell* 122, 947-956.

45 32 Feuring-Buske, M. & Hogge, D. E. (2001) *Blood* 97, 3882-3889.

33 Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., Pasche, A. C, Knabenhans, C, Macdonald, H. R. & Trumpp, A. (2004) *Genes Dev* 18, 2747-2763.

50 34 Creighton, M. P., Roel, G., Eichhorn, P. J. A., Vredeveld, L. C., Destree, O. & Bernards, R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 103,5397-5402.

55 35 Zandstra, P. W., Le, H. V., Daley, G. Q., Griffith, L. G. & Lauffenburger, D. A. (2000) *Biotechnol Bioeng.* 69,607-617.

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Un procedimiento de identificación de un agente como capaz de evitar la diferenciación mientras promueve la proliferación de una célula madre de mamífero durante el cultivo *ex vivo*, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto un agente con al menos una de las subunidades PR72/130 de la proteína fosfatasa serina/treonina PP2A y detectar la unión de dicho agente a dicha al menos una subunidad.

10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha unión se detecta por inmunotransferencia.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho agente se selecciona entre el grupo constituido por compuestos de fórmula 1-5, 7-12, 15 y 17-28.

15

20

25

30

35

40

45

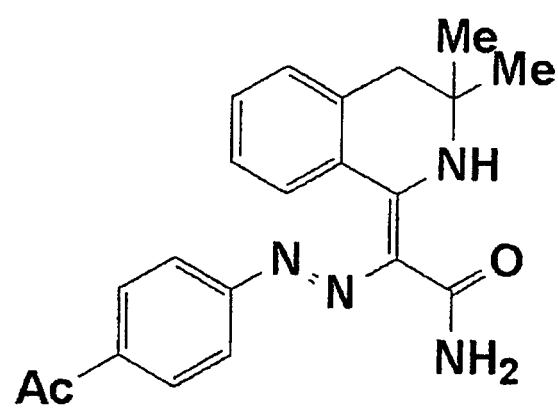
50

55

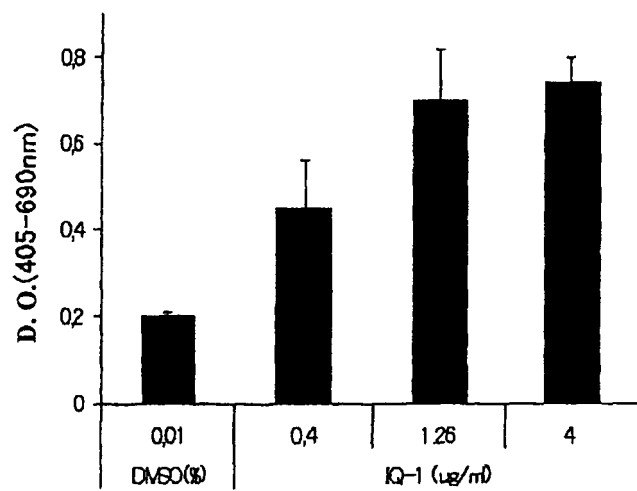
60

65

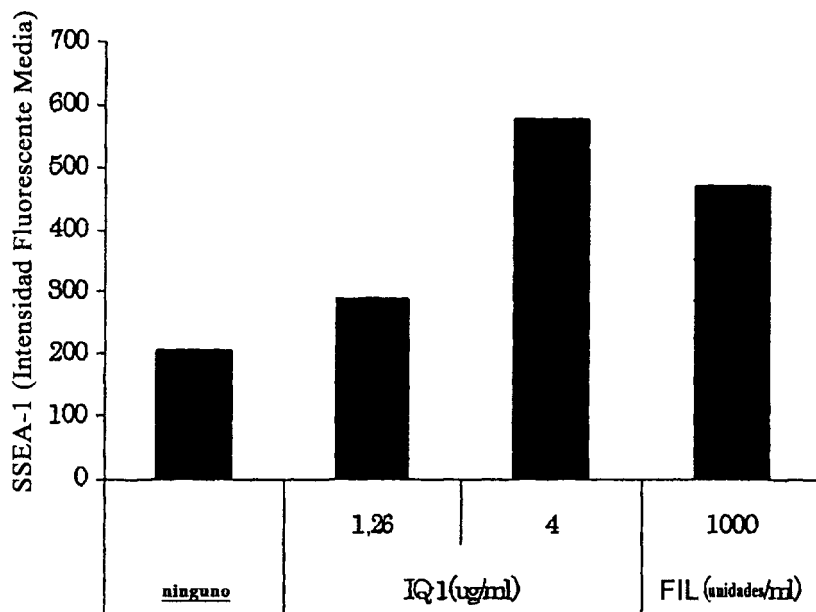
**Figura 1A**



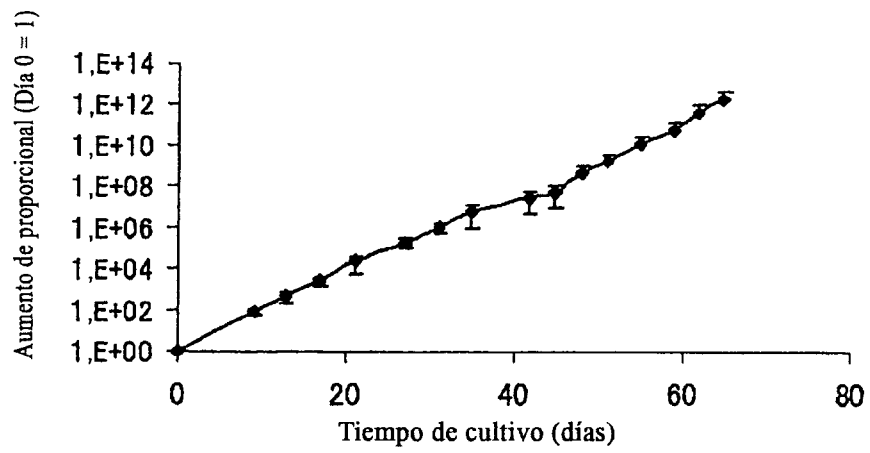
**Figura 1B**



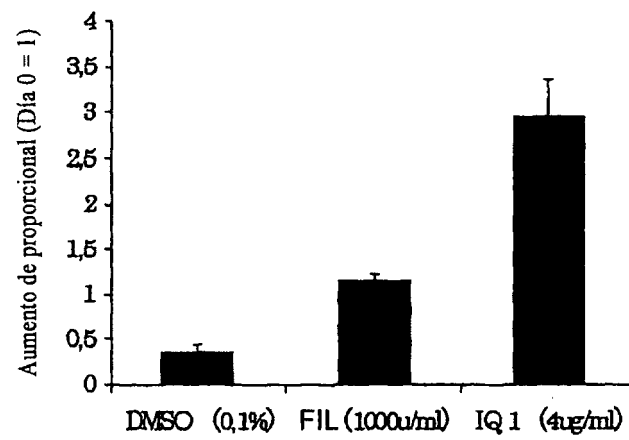
**Figura 1C**



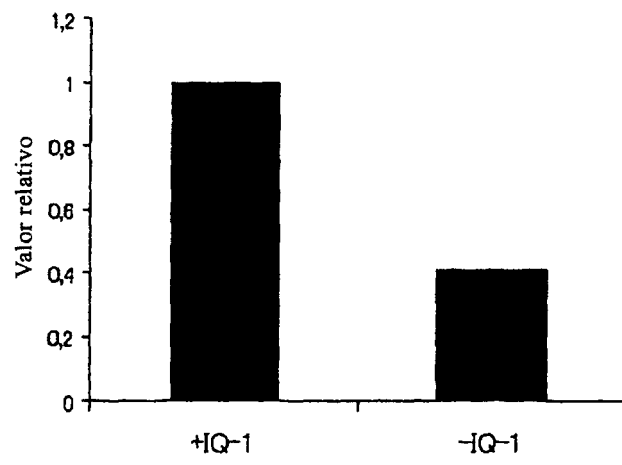
**Figura 1D**



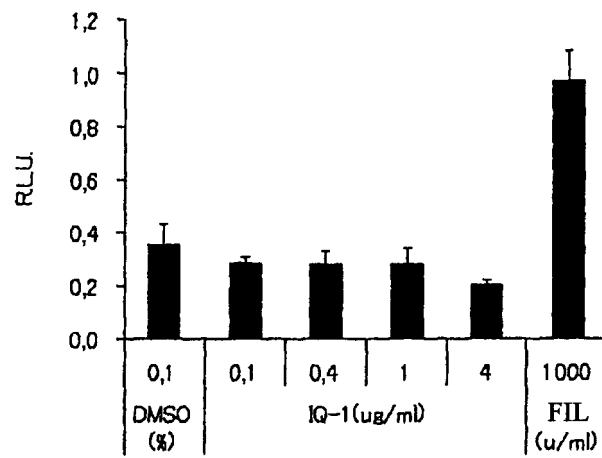
**Figura 2A**



**Figura 2B**

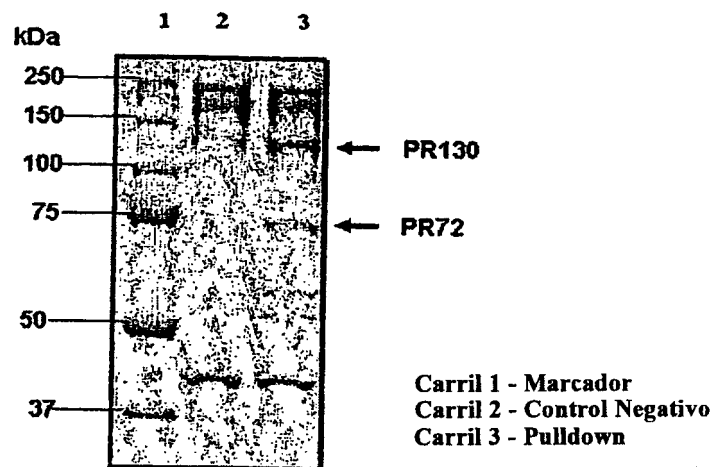


**Figura 2C**

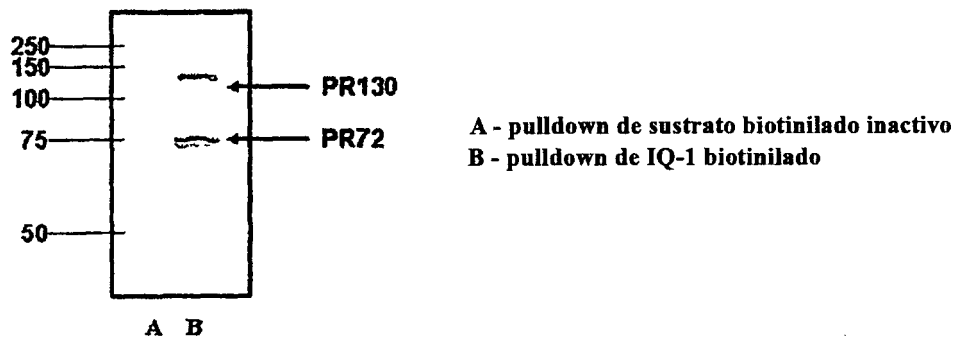


**Figura 3A**

**Mancha Afinidad Coomassie**



**Figura 3B**



**Figura 3C**

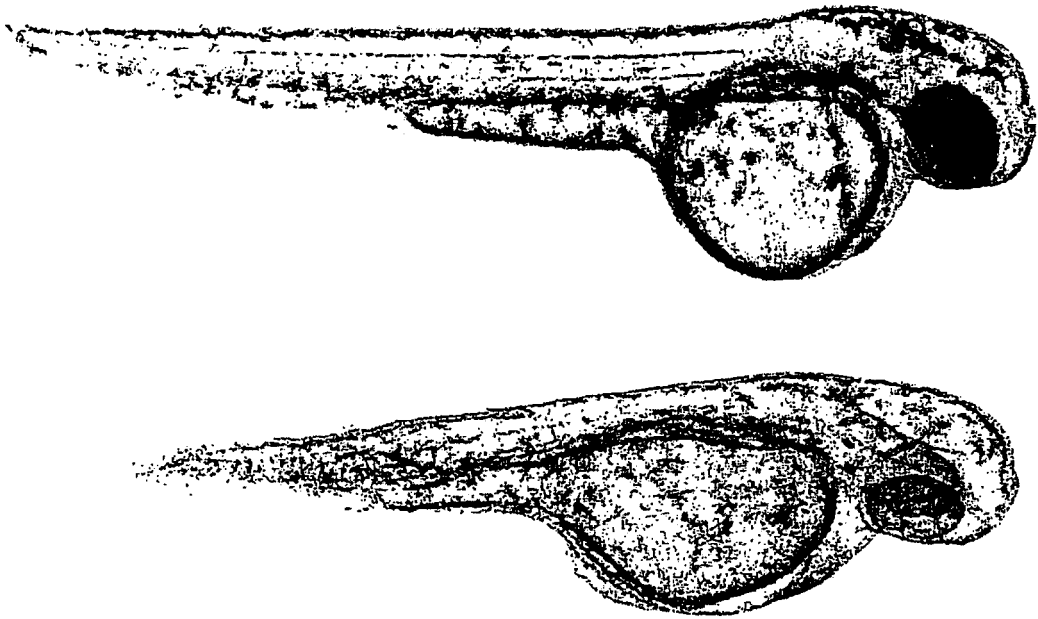
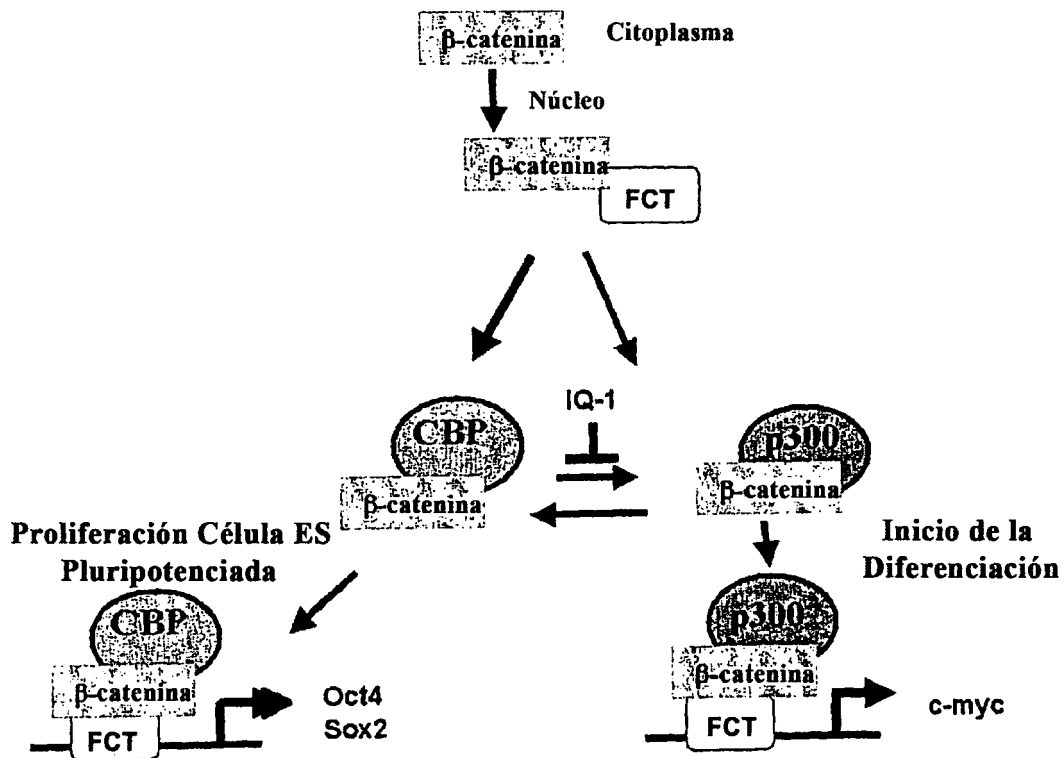
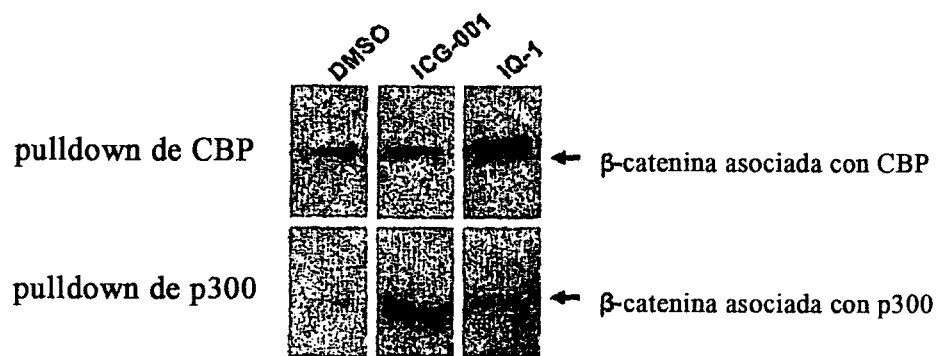


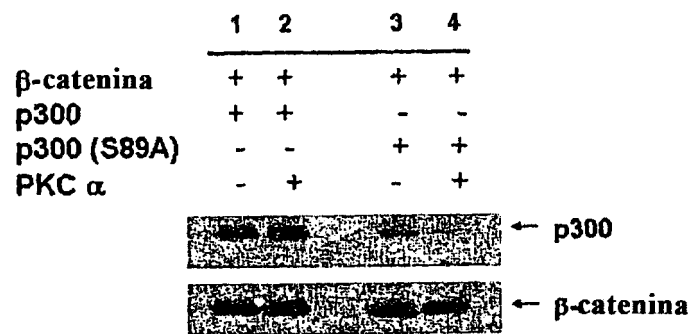
Figura 4A



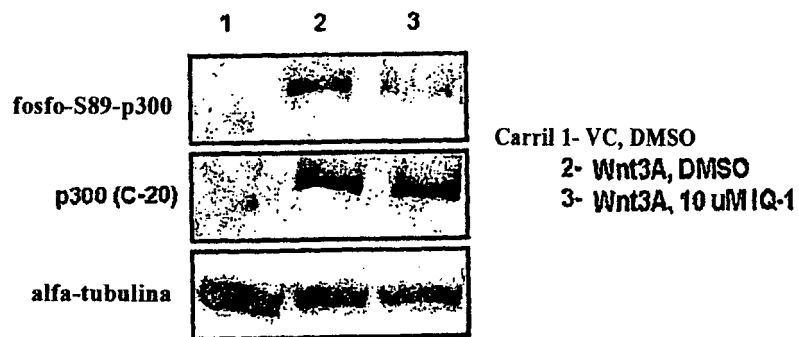
**Figura 4B**



**Figura 4C**



**Figura 4D**



**Figura 5A**

Cuerpo embrioide

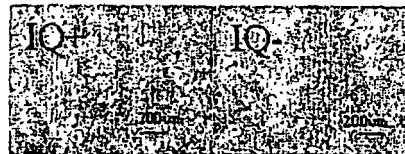


Figura 5B

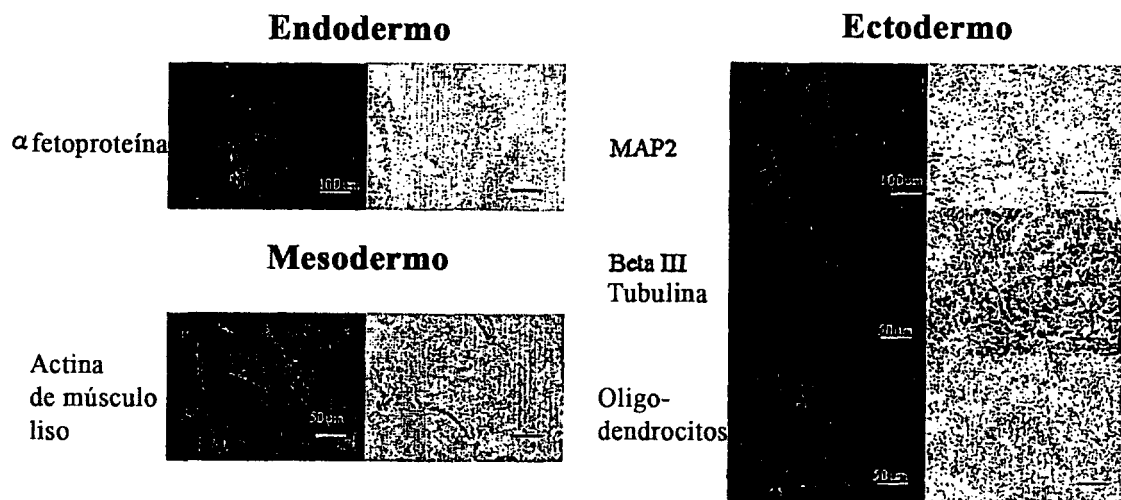


Figura 5C

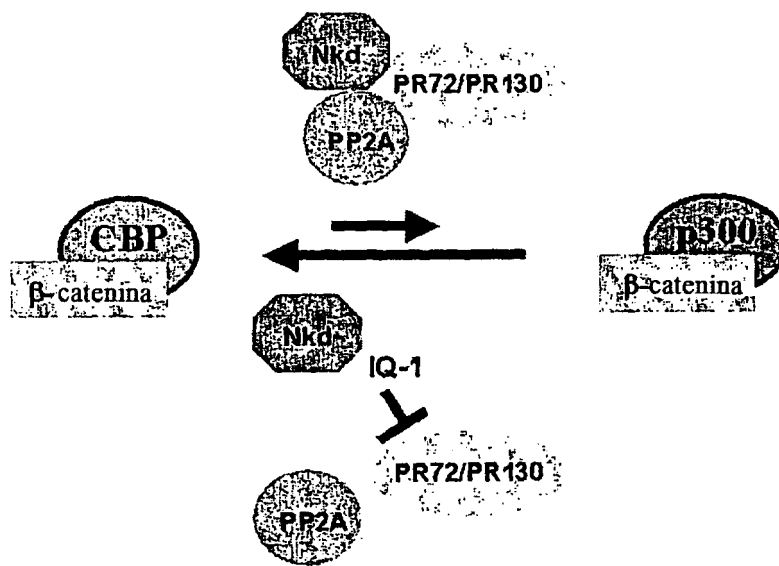
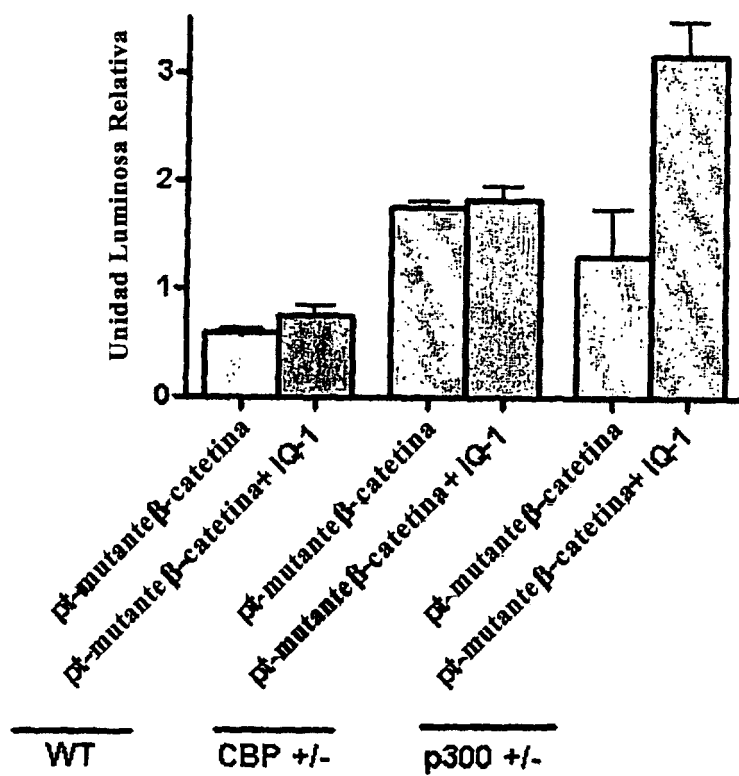
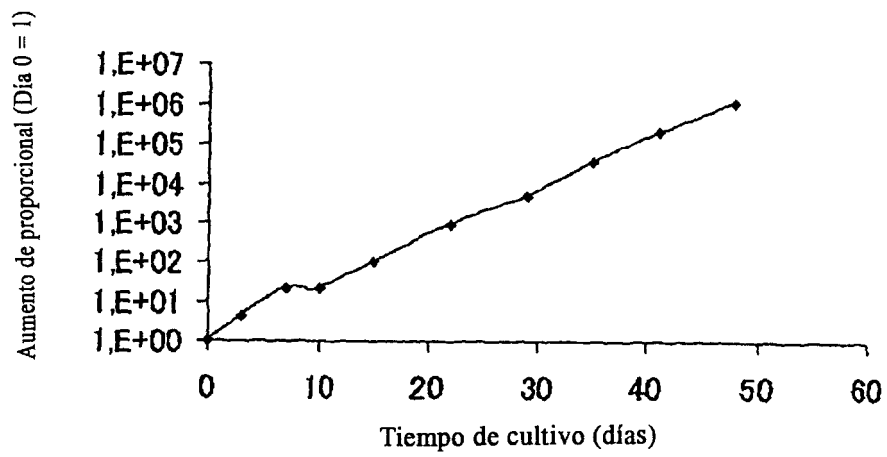


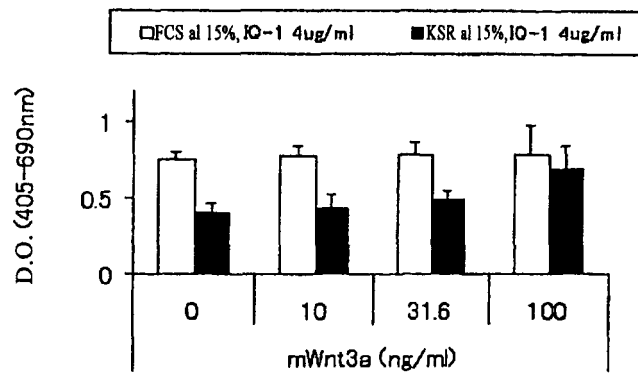
Figura 6



**Figura 7**

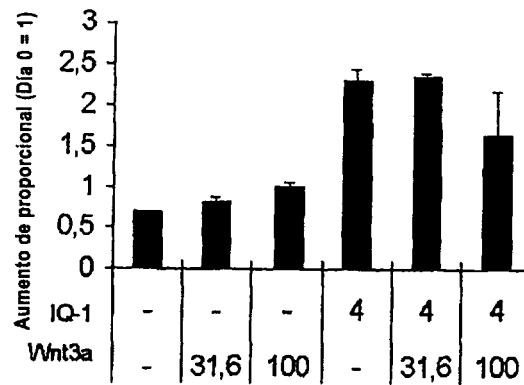


**Figura 8**



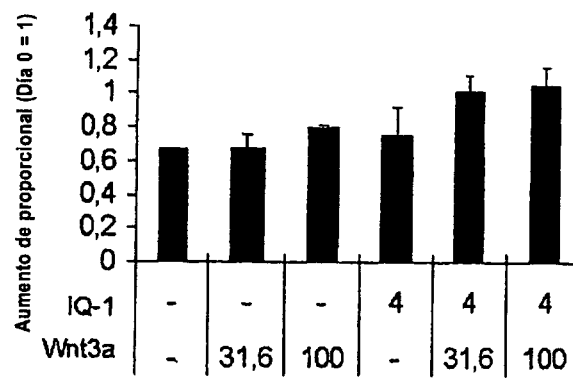
**Figura 9A**

**(a)**



**Figura 9B**

(b)



**Figura 9C**

(c)

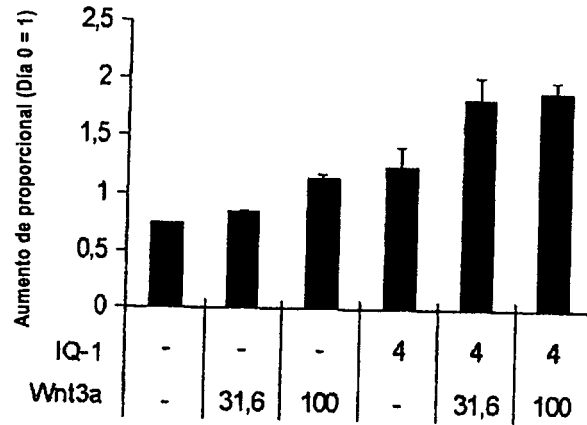
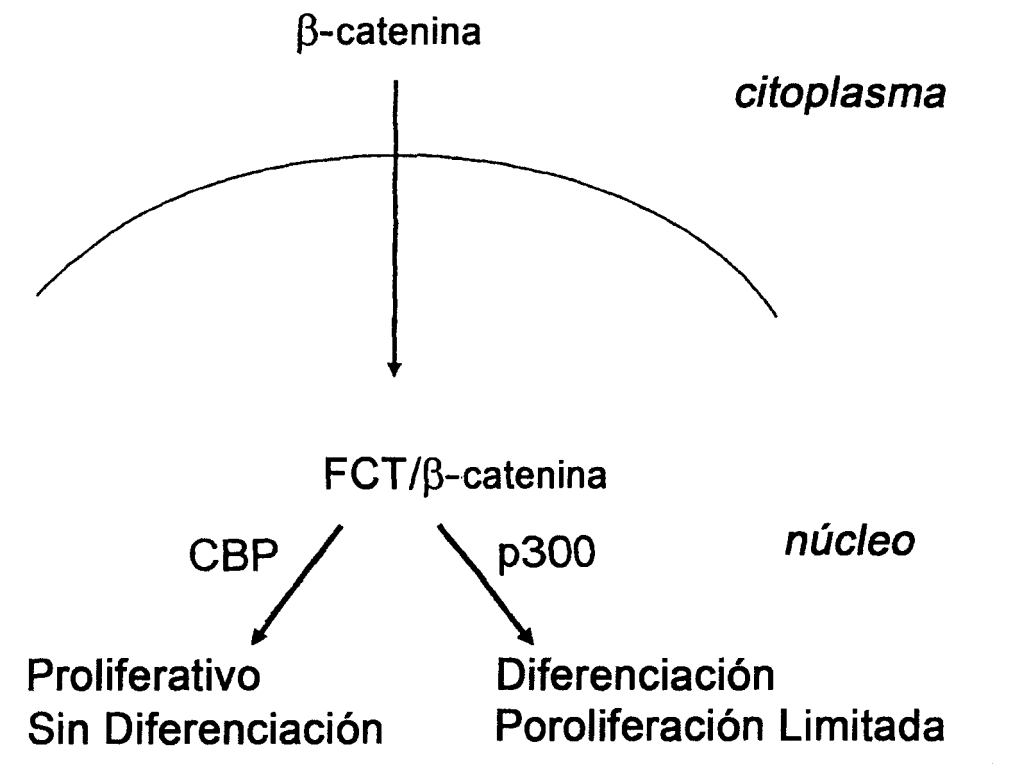


Figura 10



**Figura 11**



Medio de Diferenciación

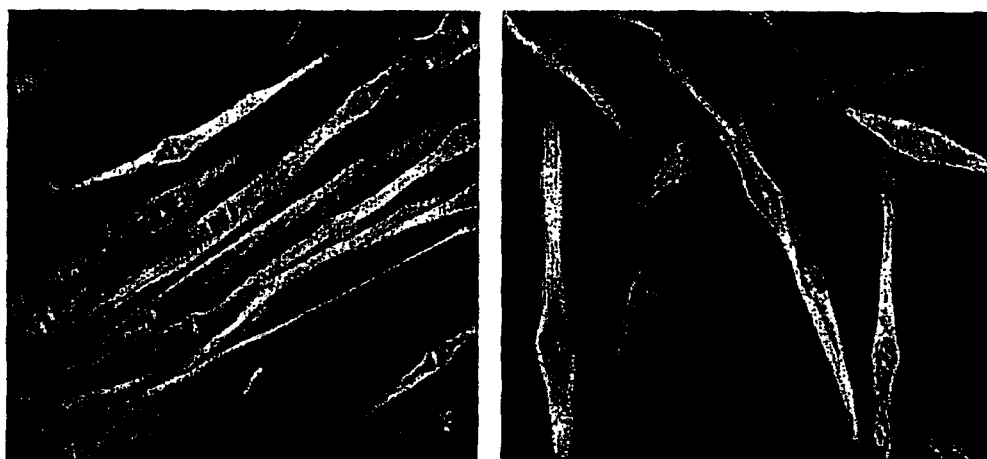


Medio de Crecimiento



Medio de Crecimiento +  
ICG-001 10  $\mu$ M

**Figura 12**



**Medio de Diferenciación**

**Medio de Crecimiento +  
ICG-001 10  $\mu$ M**

# ES 2 332 822 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTE FOR CHEMICAL GENOMICS

5 <120> EXPANSIÓN SIN SUERO DE CÉLULAS EN CULTIVO

<130> 67648-17

10 <150> 60/740.173

<151> 28-11-2005

15 <160> 18

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

20 <211> 2440

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 332 822 T3

<400> 1

5 Met Ala Glu Asn Leu Leu Asp Gly Pro Pro Asn Pro Lys Arg Ala Lys  
1 10 15 20 25 30 35 40 45 50  
Leu Ser Ser Pro Gly Phe Ser Ala Asn Ser Asn Thr Asp Phe Gly Ser  
20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80  
Leu Phe Asp Leu Glu Asn Asp Leu Pro Asp Glu Leu Ile Pro Asn Gly  
35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95  
Gly Glu Leu Gly Leu Leu Asn Ser Gly Asn Leu Val Pro Asp Ala Ala  
50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110  
Ser Lys His Lys Gln Leu Ser Glu Leu Leu Arg Gly Gly Ser Gly Ser  
65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125  
Ser Ile Asn Pro Gly Ile Gly Asn Val Ser Ala Ser Ser Pro Val Gln  
85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145  
Gln Gly Leu Gly Gly Gln Ala Gln Gly Gln Pro Asn Ser Ala Asn Met  
100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160  
Ala Ser Leu Ser Ala Met Gly Lys Gln Ala Ala Ser Thr Ser Gly Asp Ser  
115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175  
Ser Ser Pro Ser Leu Pro Lys Gln Ala Ala Ser Thr Ser Gly Pro Thr  
130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190  
Pro Ala Ala Ser Gln Ala Leu Asn Pro Gln Ala Gln Lys Gln Val Gly  
145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205  
Leu Ala Thr Ser Ser Pro Ala Thr Ser Gln Thr Gly Pro Gly Ile Cys  
165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220  
Met Asn Ala Asn Phe Asn Gln Thr His Pro Gly Leu Leu Asn Ser Asn  
180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235  
Ser Gly His Ser Leu Ile Asn Gln Ala Ser Gln Gly Gln Ala Gln Val  
195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250  
Met Asn Gly Ser Leu Gly Ala Ala Gly Arg Gly Arg Gly Ala Gly Met  
210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265  
Pro Tyr Thr Ala Pro Ala Met Gln Gly Ala Ser Ser Ser Val Leu Ala  
225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285  
Glu Thr Leu Thr Gln Val Ser Pro Gln Thr Ala Gly His Ala Gly Leu  
245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305  
Asn Thr Ala Gln Ala Gly Gly Met Ala Lys Ile Gly Met Asn Gly Thr  
260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320  
Thr Ser Pro Phe Gly Gln Pro Phe Ser Gln Ala Gly Gly Gln Pro Met  
275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335  
Gly Ala Thr Gly Val Asn Pro Gln Leu Ala Ser Lys Gln Ser Met Val  
290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350  
Asn Ser Leu Pro Thr Phe Pro Thr Asp Ile Lys Asn Thr Ser Val Thr  
305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365  
Asn Val Pro Asn Met Ser Gln Met Gln Thr Ser Val Gly Ile Val Pro  
325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385  
Thr Gln Ala Ile Ala Thr Gly Pro Thr Ala Asp Pro Glu Lys Arg Lys  
340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400  
Leu Ile Gln Gln Gln Leu Val Leu Leu Leu His Ala His Lys Cys Gln

50

55

60

65

ES 2 332 822 T3

Arg Arg 355 Glu Gln Ala Asn Gly 360 Glu Val Arg Ala Cys 365 Ser Leu Pro His  
 370 375 380  
 Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln Ala  
 385 390 395  
 Gly Lys Ala Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile Ile  
 400 405 410  
 Ser His Trp Lys Asn Cys Thr Arg His Asp Cys Pro Val Cys Leu Pro  
 420 425 430  
 Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Arg Asn Gln Gln Thr Ile Leu Gly Ser  
 435 440 445  
 Pro Ala Ser Gly Ile Gln Asn Thr Ile Gly Ser Val Gly Thr Gly Gln  
 450 455 460  
 Gln Asn Ala Thr Ser Leu Ser Asn Pro Asn Pro Ile Asp Pro Ser Ser  
 465 470 475 480  
 Met Gln Arg Ala Tyr Ala Ala Leu Gly Leu Pro Tyr Met Asn Gln Pro  
 485 490 495  
 Gln Thr Gln Leu Gln Pro Gln Val Pro Gly Gln Gln Pro Ala Gln Pro  
 500 505 510  
 Gln Thr His Gln Gln Met Arg Thr Leu Asn Pro Leu Gly Asn Asn Pro  
 515 520 525  
 Met Asn Ile Pro Ala Gly Gly Ile Thr Thr Asp Gln Gln Pro Pro Asn  
 530 535 540  
 Leu Ile Ser Glu Ser Ala Leu Pro Thr Ser Leu Gly Ala Thr Asn Pro  
 545 550 555 560  
 Leu Met Asn Asp Gly Ser Asn Ser Gly Asn Ile Gly Thr Leu Ser Thr  
 565 570 575  
 Ile Pro Thr Ala Ala Pro Pro Ser Ser Thr Gly Val Arg Lys Gly Trp  
 580 585 590  
 His Glu His Val Thr Gln Asp Leu Arg Ser His Leu Val His Lys Leu  
 595 600 605  
 Val Gln Ala Ile Phe Pro Thr Pro Asp Pro Ala Ala Leu Lys Asp Arg  
 610 615 620  
 Arg Met Glu Asn Leu Val Ala Tyr Ala Lys Lys Val Glu Gly Asp Met  
 625 630 635 640  
 Tyr Glu Ser Ala Asn Ser Arg Asp Glu Tyr Tyr His Leu Leu Ala Glu  
 645 650 655  
 Lys Ile Tyr Lys Ile Gln Lys Glu Leu Glu Glu Lys Arg Arg Ser Arg  
 660 665 670  
 Leu His Lys Gln Gly Ile Leu Gly Asn Gln Pro Ala Leu Pro Ala Pro  
 675 680 685  
 Gly Ala Gln Pro Pro Val Ile Pro Gln Ala Gln Ser Val Arg Pro Pro  
 690 695 700  
 Asn Gly Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Arg Met Gln Val Ser Gln Gly  
 705 710 715 720  
 Met Asn Ser Phe Asn Pro Met Ser Leu Gly Asn Val Gln Leu Pro Gln  
 725 730 735  
 Ala Pro Met Gly Pro Arg Ala Ala Ser Pro Met Asn His Ser Val Gln  
 740 745 750  
 Met Asn Ser Met Gly Ser Val Pro Gly Met Ala Ile Ser Pro Ser Arg  
 755 760 765  
 Met Pro Gln Pro Pro Asn Met Met Gly Ala His Thr Asn Asn Met Met  
 770 775 780  
 Ala Gln Ala Pro Ala Gln Ser Gln Phe Leu Pro Gln Asn Gln Phe Pro  
 785 790 795 800  
 Ser Ser Ser Gly Ala Met Ser Val Gly Met Gly Gln Pro Pro Ala Gln  
 805 810 815  
 Thr Gly Val Ser Gln Gly Gln Val Pro Gly Ala Ala Leu Pro Asn Pro  
 820 825 830  
 Leu Asn Met Leu Gly Pro Gln Ala Ser Gln Leu Pro Cys Pro Pro Val  
 835 840 845  
 Thr Gln Ser Pro Leu His Pro Thr Pro Pro Pro Ala Ser Thr Ala Ala  
 850 855 860  
 Gly Met Pro Ser Leu Gln His Thr Thr Pro Pro Gly Met Thr Pro Pro  
 865 870 875 880  
 Gln Pro Ala Ala Pro Thr Gln Pro Ser Thr Pro Val Ser Ser Ser Gly  
 885 890 895  
 Gln Thr Pro Thr Pro Thr Pro Gly Ser Val Pro Ser Ala Thr Gln Thr

ES 2 332 822 T3

5 Gln Ser Thr 900 Pro Thr Val Gln Ala 905 Ala Ala Gln Ala Gln Val Thr Pro  
 Gln Pro Gln Thr Pro Val Gln Pro Pro Ser Val Ala Thr Pro Gln Ser  
 915 920 925  
 930 935 940  
 Ser Gln Gln Gln Pro Thr Val His Ala Gln Pro Pro Gly Thr Pro  
 945 950 955 960  
 Leu Ser Gln Ala Ala Ala Ser Ile Asp Asn Arg Val Pro Thr Pro Ser  
 965 970 975  
 10 Thr Val Ala Ser Ala Glu Thr Asn Ser Gln Gln Pro Gly Pro Asp Val  
 980 985 990  
 Pro Val Leu Glu Met Lys Thr Glu Thr Gln Ala Glu Asp Thr Glu Pro  
 995 1000 1005  
 Asp Pro Gly Glu Ser Lys Gly Glu Pro Arg Ser Glu Met Met Glu Glu  
 1010 1015 1020  
 15 Asp Leu Gln Gly Ala Ser Gln Val Lys Glu Glu Thr Asp Ile Ala Glu  
 1025 1030 1035 1040  
 Gln Lys Ser Glu Pro Met Glu Val Glu Asp Lys Lys Pro Glu Val Lys  
 1045 1050 1055  
 20 Val Glu Val Lys Glu Glu Glu Glu Ser Ser Ser Asn Gly Thr Ala Ser  
 1060 1065 1070  
 Gln Ser Thr Ser Pro Ser Gln Pro Arg Lys Lys Ile Phe Lys Pro Glu  
 1075 1080 1085  
 Glu Leu Arg Gln Ala Leu Met Pro Thr Leu Glu Ala Leu Tyr Arg Gln  
 1090 1095 1100  
 25 Asp Pro Glu Ser Leu Pro Phe Arg Gln Pro Val Asp Pro Gln Leu Leu  
 1105 1110 1115 1120  
 Gly Ile Pro Asp Tyr Phe Asp Ile Val Lys Asn Pro Met Asp Leu Ser  
 1125 1130 1135  
 30 Thr Ile Lys Arg Lys Leu Asp Thr Gly Gln Tyr Gln Glu Pro Trp Gln  
 1140 1145 1150  
 Tyr Val Asp Asp Val Trp Leu Met Phe Asn Asn Ala Trp Leu Tyr Asn  
 1155 1160 1165  
 Arg Lys Thr Ser Arg Val Tyr Lys Phe Cys Ser Lys Leu Ala Glu Val  
 1170 1175 1180  
 35 Phe Glu Gln Glu Ile Asp Pro Val Met Gln Ser Leu Gly Tyr Cys Cys  
 1185 1190 1195 1200  
 Gly Arg Lys Tyr Glu Phe Ser Pro Gln Thr Leu Cys Cys Tyr Gly Lys  
 1205 1210 1215  
 Gln Leu Cys Thr Ile Pro Arg Asp Ala Tyr Tyr Ser Tyr Gln Asn  
 1220 1225 1230  
 40 Arg Tyr His Phe Cys Glu Lys Cys Phe Thr Glu Ile Gln Gly Glu Asn  
 1235 1240 1245  
 Val Thr Leu Gly Asp Asp Pro Ser Gln Pro Gln Thr Thr Ile Ser Lys  
 1250 1255 1260  
 45 Asp Gln Phe Glu Lys Lys Lys Asn Asp Thr Leu Asp Pro Glu Pro Phe  
 1265 1270 1275 1280  
 Val Asp Cys Lys Glu Cys Gly Arg Lys Met His Gln Ile Cys Val Leu  
 1285 1290 1295  
 His Tyr Asp Ile Ile Trp Pro Ser Gly Phe Val Cys Asp Asn Cys Leu  
 1300 1305 1310  
 50 Lys Lys Thr Gly Arg Pro Arg Lys Glu Asn Lys Phe Ser Ala Lys Arg  
 1315 1320 1325  
 Leu Gln Thr Thr Arg Leu Gly Asn His Leu Glu Asp Arg Val Asn Lys  
 1330 1335 1340  
 Phe Leu Arg Arg Gln Asn His Pro Glu Ala Gly Glu Val Phe Val Arg  
 1345 1350 1355 1360  
 55 Val Val Ala Ser Ser Asp Lys Thr Val Glu Val Lys Pro Gly Met Lys  
 1365 1370 1375  
 Ser Arg Phe Val Asp Ser Gly Glu Met Ser Glu Ser Phe Pro Tyr Arg  
 1380 1385 1390  
 60 Thr Lys Ala Leu Phe Ala Phe Glu Glu Ile Asp Gly Val Asp Val Cys  
 1395 1400 1405  
 Phe Phe Gly Met His Val Gln Asp Thr Ala Leu Ile Ala Pro His Gln  
 1410 1415 1420  
 Ile Gln Gly Cys Val Tyr Ile Ser Tyr Leu Asp Ser Ile His Phe Phe  
 1425 1430 1435 1440  
 65 Arg Pro Arg Cys Leu Arg Thr Ala Val Tyr His Glu Ile Leu Ile Gly

ES 2 332 822 T3

Tyr Leu Glu Tyr Val Lys Lys Leu Val Tyr Val Thr Ala His Ile Trp  
 1445 1450 1455  
 1460 1465 1470  
 Ala Cys Pro Pro Ser Glu Gly Asp Asp Tyr Ile Phe His Cys His Pro  
 1475 1480 1485  
 Pro Asp Gln Lys Ile Pro Lys Pro Lys Arg Leu Gln Glu Trp Tyr Lys  
 1490 1495 1500  
 Lys Met Leu Asp Lys Ala Phe Ala Glu Arg Ile Ile Asn Asp Tyr Lys  
 1505 1510 1515 1520  
 Asp Ile Phe Lys Gln Ala Asn Glu Asp Arg Leu Thr Ser Ala Lys Glu  
 1525 1530 1535  
 Leu Pro Tyr Phe Glu Gly Asp Phe Trp Pro Asn Val Leu Glu Glu Ser  
 1540 1545 1550  
 Ile Lys Glu Leu Glu Gln Glu Glu Glu Arg Lys Lys Glu Glu Ser  
 1555 1560 1565  
 Thr Ala Ala Ser Glu Thr Pro Glu Gly Ser Gln Gly Asp Ser Lys Asn  
 1570 1575 1580  
 Ala Lys Lys Lys Asn Asn Lys Lys Thr Asn Lys Asn Lys Ser Ser Ile  
 1585 1590 1595 1600  
 Ser Arg Ala Asn Lys Lys Lys Pro Ser Met Pro Asn Val Ser Asn Asp  
 1605 1610 1615  
 Leu Ser Gln Lys Leu Tyr Ala Thr Met Glu Lys His Lys Glu Val Phe  
 1620 1625 1630  
 Phe Val Ile His Leu His Ala Gly Pro Val Ile Ser Thr Gln Pro Pro  
 1635 1640 1645  
 Ile Val Asp Pro Asp Pro Leu Leu Ser Cys Asp Leu Met Asp Gly Arg  
 1650 1655 1660  
 Asp Ala Phe Leu Thr Leu Ala Arg Asp Lys His Trp Glu Phe Ser Ser  
 1665 1670 1675 1680  
 Leu Arg Arg Ser Lys Trp Ser Thr Leu Cys Met Leu Val Glu Leu His  
 1685 1690 1695  
 Thr Gln Gly Gln Asp Arg Phe Val Tyr Thr Cys Asn Glu Cys Lys His  
 1700 1705 1710  
 His Val Glu Thr Arg Trp His Cys Thr Val Cys Glu Asp Tyr Asp Leu  
 1715 1720 1725  
 Cys Ile Asn Cys Tyr Asn Thr Lys Ser His Thr His Lys Met Val Lys  
 1730 1735 1740  
 Trp Gly Leu Gly Leu Asp Asp Glu Gly Ser Ser Gln Gly Glu Pro Gln  
 1745 1750 1755 1760  
 Ser Lys Ser Pro Gln Glu Ser Arg Arg Leu Ser Ile Gln Arg Cys Ile  
 1765 1770 1775  
 Gln Ser Leu Val His Ala Cys Gln Cys Arg Asn Ala Asn Cys Ser Leu  
 1780 1785 1790  
 Pro Ser Cys Gln Lys Met Lys Arg Val Val Gln His Thr Lys Gly Cys  
 1795 1800 1805  
 Lys Arg Lys Thr Asn Gly Gly Cys Pro Val Cys Lys Gln Leu Ile Ala  
 1810 1815 1820  
 Leu Cys Cys Tyr His Ala Lys His Cys Gln Glu Asn Lys Cys Pro Val  
 1825 1830 1835 1840  
 Pro Phe Cys Leu Asn Ile Lys His Asn Val Arg Gln Gln Gln Ile Gln  
 1845 1850 1855  
 His Cys Leu Gln Ala Gln Leu Met Arg Arg Arg Met Ala Thr Met  
 1860 1865 1870  
 Asn Thr Arg Asn Val Pro Gln Gln Ser Leu Pro Ser Pro Thr Ser Ala  
 1875 1880 1885  
 Pro Pro Gly Thr Pro Thr Gln Gln Pro Ser Thr Pro Gln Thr Pro Gln  
 1890 1895 1900  
 Pro Pro Ala Gln Pro Gln Pro Ser Pro Val Asn Met Ser Pro Ala Gly  
 1905 1910 1915 1920  
 Phe Pro Asn Val Ala Arg Thr Gln Pro Pro Thr Ile Val Ser Ala Gly  
 1925 1930 1935  
 Lys Pro Thr Asn Gln Val Pro Ala Pro Pro Pro Ala Gln Pro Pro  
 1940 1945 1950  
 Pro Ala Ala Val Glu Ala Ala Arg Gln Ile Glu Arg Glu Ala Gln Gln  
 1955 1960 1965  
 Gln Gln His Leu Tyr Arg Ala Asn Ile Asn Asn Gly Met Pro Pro Gly  
 1970 1975 1980  
 Arg Asp Gly Met Gly Thr Pro Gly Ser Gln Met Thr Pro Val Gly Leu



ES 2 332 822 T3

<400> 2

	Met	Ala	Glu	Asn	Val	Val	Glu	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Ala	Lys	Arg	Pro	
5	1	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Asp	Gly	Thr	Asp
				20					25					30			
	Phe	Gly	Ser	Leu	Phe	Asp	Leu	Glu	His	Asp	Leu	Pro	Asp	Glu	Leu	Ile	
			35					40					45				
10	Asn	Ser	Thr	Glu	Leu	Gly	Leu	Thr	Asn	Gly	Gly	Asp	Ile	Asn	Gln	Leu	
		50					55					60					
	Gln	Thr	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Gln	Asp	Ala	Ala	Ser	Lys	His	Lys	Gln	
	65					70					75					80	
	Leu	Ser	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Asn	Leu	Asn	Met	Gly	
				85						90					95		
15	Val	Gly	Gly	Pro	Gly	Gln	Val	Met	Ala	Ser	Gln	Ala	Gln	Gln	Ser	Ser	
			100						105					110			
	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Ile	Asn	Ser	Met	Val	Lys	Ser	Pro	Met	Thr	Gln	
			115						120				125				
	Ala	Gly	Leu	Thr	Ser	Pro	Asn	Met	Gly	Met	Gly	Thr	Ser	Gly	Pro	Asn	
		130					135					140					
20	Gln	Gly	Pro	Thr	Gln	Ser	Thr	Gly	Met	Met	Asn	Ser	Pro	Val	Asn	Gln	
	145					150					155					160	
	Pro	Ala	Met	Gly	Met	Asn	Thr	Gly	Thr	Asn	Ala	Gly	Met	Asn	Pro	Gly	
				165						170					175		
	Met	Leu	Ala	Ala	Gly	Asn	Gly	Gln	Gly	Ile	Met	Pro	Asn	Gln	Val	Met	
			180						185					190			
25	Asn	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly	Arg	Gln	Asp	Met	Gln	Tyr	Pro	
			195					200					205				
	Asn	Pro	Gly	Met	Gly	Ser	Ala	Gly	Asn	Leu	Leu	Thr	Glu	Pro	Leu	Gln	
		210					215					220					
30	Gln	Gly	Ser	Pro	Gln	Met	Gly	Gly	Gln	Thr	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Gln	
	225					230					235					240	
	Pro	Leu	Lys	Met	Gly	Met	Met	Asn	Asn	Pro	Asn	Pro	Tyr	Gly	Ser	Pro	
				245						250					255		
	Tyr	Thr	Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Gln	Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Leu	
			260						265					270			
35	Gln	Ile	Gln	Thr	Lys	Thr	Val	Leu	Ser	Asn	Asn	Leu	Ser	Pro	Phe	Ala	
		275						280					285				
	Met	Asp	Lys	Lys	Ala	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Met	Pro	Asn	Met	Gly	Gln	
		290					295					300					
	Gln	Pro	Ala	Pro	Gln	Val	Gln	Gln	Pro	Gly	Leu	Val	Thr	Pro	Val	Ala	
	305					310					315					320	
40	Gln	Gly	Met	Gly	Ser	Gly	Ala	His	Thr	Ala	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Lys	
				325						330					335		
	Leu	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	His	Ala	His	Lys	Cys	Gln	
			340						345					350			
45	Arg	Arg	Glu	Gln	Ala	Asn	Gly	Glu	Val	Arg	Gln	Cys	Asn	Leu	Pro	His	
			355					360					365				
	Cys	Arg	Thr	Met	Lys	Asn	Val	Leu	Asn	His	Met	Thr	His	Cys	Gln	Ser	
		370					375					380					
	Gly	Lys	Ser	Cys	Gln	Val	Ala	His	Cys	Ala	Ser	Ser	Arg	Gln	Ile	Ile	
	385					390					395					400	
50	Ser	His	Trp	Lys	Asn	Cys	Thr	Arg	His	Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	
				405						410					415		
	Leu	Lys	Asn	Ala	Gly	Asp	Lys	Arg	Asn	Gln	Gln	Pro	Ile	Leu	Thr	Gly	
			420						425					430			
	Ala	Pro	Val	Gly	Leu	Gly	Asn	Pro	Ser	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Gln	Gln	
			435					440					445				
55	Ser	Ala	Pro	Asn	Leu	Ser	Thr	Val	Ser	Gln	Ile	Asp	Pro	Ser	Ser	Ile	
		450					455					460					
	Glu	Arg	Ala	Tyr	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Gln	Val	Asn	Gln	Met	
	465					470					475					480	
	Pro	Thr	Gln	Pro	Gln	Val	Gln	Ala	Lys	Asn	Gln	Gln	Asn	Gln	Gln	Pro	
				485						490					495		
60	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Gly	Met	Arg	Pro	Met	Ser	Asn	Met	Ser	Ala	Ser	
			500						505					510			
	Pro	Met	Gly	Val	Asn	Gly	Gly	Val	Gly	Val	Gln	Thr	Pro	Ser	Leu	Leu	
			515					520					525				
	Ser	Asp	Ser	Met	Leu	His	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Gln	Asn	Pro	Met	Met	
		530					535					540					
65	Ser	Glu	Asn	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Leu	Gly	Pro	Met	Pro	Thr	Ala	Ala	
	545					550					555					560	
	Gln	Pro	Ser	Thr	Thr	Gly	Ile	Arg	Lys	Gln	Trp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	

ES 2 332 822 T3

				565					570					575			
	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	His	Leu	Val	His	Lys	Leu	Val	Gln	Ala	Ile	Phe	
				580					585					590			
5	Pro	Thr	Pro	Asp	Pro	Ala	Ala	Leu	Lys	Asp	Arg	Arg	Met	Glu	Asn	Leu	
			595					600					605				
	Val	Ala	Tyr	Ala	Arg	Lys	Val	Glu	Gly	Asp	Met	Tyr	Glu	Ser	Ala	Asn	
			610				615					620					
	Asn	Arg	Ala	Glu	Tyr	Tyr	His	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Tyr	Lys	Ile	
	625				630						635					640	
10	Gln	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Arg	Arg	Thr	Arg	Leu	Gln	Lys	Gln	Asn	
				645						650						655	
	Met	Leu	Pro	Asn	Ala	Ala	Gly	Met	Val	Pro	Val	Ser	Met	Asn	Pro	Gly	
				660					665					670			
	Pro	Asn	Met	Gly	Gln	Pro	Gln	Pro	Gly	Met	Thr	Ser	Asn	Gly	Pro	Leu	
			675					680					685				
15	Pro	Asp	Pro	Ser	Met	Ile	Arg	Gly	Ser	Val	Pro	Asn	Gln	Met	Met	Pro	
			690				695					700					
	Arg	Ile	Thr	Pro	Gln	Ser	Gly	Leu	Asn	Gln	Phe	Gly	Gln	Met	Ser	Met	
	705				710						715					720	
20	Ala	Gln	Pro	Pro	Ile	Val	Pro	Arg	Gln	Thr	Pro	Pro	Leu	Gln	His	His	
				725						730					735		
	Gly	Gln	Leu	Ala	Gln	Pro	Gly	Ala	Leu	Asn	Pro	Pro	Met	Gly	Tyr	Gly	
			740						745					750			
	Pro	Arg	Met	Gln	Gln	Pro	Ser	Asn	Gln	Gly	Gln	Phe	Leu	Pro	Gln	Thr	
			755					760					765				
25	Gln	Phe	Pro	Ser	Gln	Gly	Met	Asn	Val	Thr	Asn	Ile	Pro	Leu	Ala	Pro	
			770				775					780					
	Ser	Ser	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Ser	Gln	Ala	Gln	Met	Ser	Ser	Ser	Ser	
	785				790						795					800	
	Cys	Pro	Val	Asn	Ser	Pro	Ile	Met	Pro	Pro	Gly	Ser	Gln	Gly	Ser	His	
				805						810					815		
30	Ile	His	Cys	Pro	Gln	Leu	Pro	Gln	Pro	Ala	Leu	His	Gln	Asn	Ser	Pro	
				820					825					830			
	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Pro	Thr	Pro	His	His	Thr	Pro	Pro	Ser	
			835				840						845				
35	Ile	Gly	Ala	Gln	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	
			850				855					860					
	Thr	Pro	Pro	Ala	Met	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln	Ser	Gln	Ala	Leu	His	Pro	
	865				870						875					880	
	Pro	Pro	Arg	Gln	Thr	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Gln	Leu	Pro	Gln	Gln	
				885						890					895		
40	Val	Gln	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Asp	Gln	Pro	Gln	Gln	
				900					905					910			
	Gln	Pro	Arg	Ser	Gln	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Val	Pro	Thr	Pro	Asn	
			915					920					925				
45	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Gln	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Ser	Gln	Pro	Ala	
			930				935					940					
	Val	Ser	Ile	Glu	Gly	Gln	Val	Ser	Asn	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Thr	
	945				950						955					960	
	Glu	Val	Asn	Ser	Gln	Ala	Ile	Ala	Glu	Lys	Gln	Pro	Ser	Gln	Glu	Val	
				965						970					975		
50	Lys	Met	Glu	Ala	Lys	Met	Glu	Val	Asp	Gln	Pro	Glu	Pro	Ala	Asp	Thr	
				980					985					990			
	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys	Val	Glu	Asp	Cys	Lys	Met	Glu	
			995					1000					1005				
	Ser	Thr	Glu	Thr	Glu	Glu	Arg	Ser	Thr	Glu	Leu	Lys	Thr	Glu	Ile	Lys	
	1010						1015						1020				
55	Glu	Glu	Glu	Asp	Gln	Pro	Ser	Thr	Ser	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Pro	Ala	
	1025				1030						1035					1040	
	Pro	Gly	Gln	Ser	Lys	Lys	Lys	Ile	Phe	Lys	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	
				1045						1050					1055		
60	Ala	Leu	Met	Pro	Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Glu	Ser	
			1060						1065					1070			
	Leu	Pro	Phe	Arg	Gln	Pro	Val	Asp	Pro	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Pro	Asp	
			1075					1080					1085				
	Tyr	Phe	Asp	Ile	Val	Lys	Ser	Pro	Met	Asp	Leu	Ser	Thr	Ile	Lys	Arg	
	1090						1095						1100				
65	Lys	Leu	Asp	Thr	Gly	Gln	Tyr	Gln	Glu	Pro	Trp	Gln	Tyr	Val	Asp	Asp	

ES 2 332 822 T3

1105 1110 1115 1120  
 Ile Trp Leu Met Phe Asn Asn Ala Trp Leu Tyr Asn Arg Lys Thr Ser  
 Arg Val Tyr Lys Tyr Cys Ser Lys Leu Ser Glu Val Phe Glu Gln Glu  
 5 Ile Asp Pro Val Met Gln Ser Leu Gly Tyr Cys Cys Gly Arg Lys Leu  
 Glu Phe Ser Pro Gln Thr Leu Cys Cys Tyr Gly Lys Gln Leu Cys Thr  
 10 Ile Pro Arg Asp Ala Thr Tyr Tyr Ser Tyr Gln Asn Arg Tyr His Phe  
 Cys Glu Lys Cys Phe Asn Glu Ile Gln Gly Glu Ser Val Ser Leu Gly  
 Asp Asp Pro Ser Gln Pro Gln Thr Thr Ile Asn Lys Glu Gln Phe Ser  
 15 Lys Arg Lys Asn Asp Thr Leu Asp Pro Glu Leu Phe Val Glu Cys Thr  
 Glu Cys Gly Arg Lys Met His Gln Ile Cys Val Leu His His Glu Ile  
 Ile Trp Pro Ala Gly Phe Val Cys Asp Gly Cys Leu Lys Lys Ser Ala  
 20 Arg Thr Arg Lys Glu Asn Lys Phe Ser Ala Lys Arg Leu Pro Ser Thr  
 Arg Leu Gly Thr Phe Leu Glu Asn Arg Val Asn Asp Phe Leu Arg Arg  
 Gln Asn His Pro Glu Ser Gly Glu Val Thr Val Arg Val Val His Ala  
 25 Ser Asp Lys Thr Val Glu Val Lys Pro Gly Met Lys Ala Arg Phe Val  
 Asp Ser Gly Glu Met Ala Glu Ser Phe Pro Tyr Arg Thr Lys Ala Leu  
 Phe Ala Phe Glu Glu Ile Asp Gly Val Asp Leu Cys Phe Phe Gly Met  
 30 His Val Gln Glu Tyr Gly Ser Asp Cys Pro Pro Asn Gln Arg Arg  
 Val Tyr Ile Ser Tyr Leu Asp Ser Val His Phe Phe Arg Pro Lys Cys  
 Leu Arg Thr Ala Val Tyr His Glu Ile Leu Ile Gly Tyr Leu Glu Tyr  
 35 Val Lys Lys Leu Gly Tyr Thr Thr Gly His Ile Trp Ala Cys Pro Pro  
 Ser Glu Gly Asp Asp Tyr Ile Phe His Cys His Pro Pro Asp Gln Lys  
 Ile Pro Lys Pro Lys Arg Leu Gln Glu Trp Tyr Lys Lys Met Leu Asp  
 Lys Ala Val Ser Glu Arg Ile Val His Asp Tyr Lys Asp Ile Phe Lys  
 45 Gln Ala Thr Glu Asp Arg Leu Thr Ser Ala Lys Glu Leu Pro Tyr Phe  
 Glu Gly Asp Phe Trp Pro Asn Val Leu Glu Glu Ser Ile Lys Glu Leu  
 50 Ser Thr Asp Val Thr Lys Gly Asp Ser Lys Asn Ala Lys Lys Lys Asn  
 Asn Lys Lys Thr Ser Lys Asn Lys Ser Ser Leu Ser Arg Gly Asn Lys  
 Lys Lys Pro Gly Met Pro Asn Val Ser Asn Asp Leu Ser Gln Lys Leu  
 Tyr Ala Thr Met Glu Lys His Lys Glu Val Phe Phe Val Ile Arg Leu  
 55 Ile Ala Gly Pro Ala Ala Asn Ser Leu Pro Pro Ile Val Asp Pro Asp  
 Pro Leu Ile Pro Cys Asp Leu Met Asp Gly Arg Asp Ala Phe Leu Thr  
 60 Leu Ala Arg Asp Lys His Leu Glu Phe Ser Ser Leu Arg Arg Ala Gln  
 Trp Ser Thr Met Cys Met Leu Val Glu Leu His Thr Gln Ser Gln Asp  
 65

ES 2 332 822 T3

1650 1655 1660  
 Arg Phe Val Tyr Thr Cys Asn Glu Cys Lys His His Val Glu Thr Arg  
 1665 1670 1675 1680  
 Trp His Cys Thr Val Cys Glu Asp Tyr Asp Leu Cys Ile Thr Cys Tyr  
 5 Asn Thr Lys Asn His Asp His Lys Met Glu Lys Leu Gly Leu Gly Leu  
 1700 1705 1710  
 Asp Asp Glu Ser Asn Asn Gln Gln Ala Ala Thr Gln Ser Pro Gly  
 1715 1720 1725  
 10 Asp Ser Arg Arg Leu Ser Ile Gln Arg Cys Ile Gln Ser Leu Val His  
 1730 1735 1740  
 Ala Cys Gln Cys Arg Asn Ala Asn Cys Ser Leu Pro Ser Cys Gln Lys  
 1745 1750 1755 1760  
 Met Lys Arg Val Val Gln His Thr Lys Gly Cys Lys Arg Lys Thr Asn  
 15 1765 1770 1775  
 Gly Gly Cys Pro Ile Cys Lys Gln Leu Ile Ala Leu Cys Cys Tyr His  
 1780 1785 1790  
 Ala Lys His Cys Gln Glu Asn Lys Cys Pro Val Pro Phe Cys Leu Asn  
 1795 1800 1805  
 20 Ile Lys Gln Lys Leu Arg Gln Gln Gln Leu Gln His Arg Leu Gln Gln  
 1810 1815 1820  
 Ala Gln Met Leu Arg Arg Met Ala Ser Met Gln Arg Thr Gly Val  
 1825 1830 1835 1840  
 Val Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Ser Pro Thr Pro Ala Thr Pro Thr  
 1845 1850 1855  
 25 Thr Pro Thr Gly Gln Gln Pro Thr Thr Pro Gln Thr Pro Gln Pro Thr  
 1860 1865 1870  
 Ser Gln Pro Gln Pro Thr Pro Pro Asn Ser Met Pro Pro Tyr Leu Pro  
 1875 1880 1885  
 Arg Thr Gln Ala Ala Gly Pro Val Ser Gln Gly Lys Ala Ala Gly Gln  
 1890 1895 1900  
 30 Val Thr Pro Pro Thr Pro Pro Gln Thr Ala Gln Pro Pro Leu Pro Gly  
 1905 1910 1915 1920  
 Pro Pro Pro Thr Ala Val Glu Met Ala Met Gln Ile Gln Arg Ala Ala  
 1925 1930 1935  
 35 Glu Thr Gln Arg Gln Met Ala His Val Gln Ile Phe Gln Arg Pro Ile  
 1940 1945 1950  
 Gln His Gln Met Pro Pro Met Thr Pro Met Ala Pro Met Gly Met Asn  
 1955 1960 1965  
 Pro Pro Pro Met Thr Arg Gly Pro Ser Gly His Leu Glu Pro Gly Met  
 1970 1975 1980  
 40 Gly Pro Thr Gly Met Gln Gln Gln Pro Pro Trp Ser Gln Gly Gly Leu  
 1985 1990 1995 2000  
 Pro Gln Pro Gln Leu Gln Ser Gly Met Pro Arg Pro Ala Met Met  
 2005 2010 2015  
 Ser Val Ala Gln His Gly Gln Pro Leu Asn Met Ala Pro Gln Pro Gly  
 2020 2025 2030  
 45 Leu Gly Gln Val Gly Ile Ser Pro Leu Lys Pro Gly Thr Val Ser Gln  
 2035 2040 2045  
 Gln Ala Leu Gln Asn Leu Leu Arg Thr Leu Arg Ser Pro Ser Ser Pro  
 2050 2055 2060  
 50 Leu Gln Gln Gln Gln Val Leu Ser Ile Leu His Ala Asn Pro Gln Leu  
 2065 2070 2075 2080  
 Leu Ala Ala Phe Ile Lys Gln Arg Ala Ala Lys Tyr Ala Asn Ser Asn  
 2085 2090 2095  
 Pro Gln Pro Ile Pro Gly Gln Pro Gly Met Pro Gln Gly Gln Pro Gly  
 2100 2105 2110  
 55 Leu Gln Pro Pro Thr Met Pro Gly Gln Gln Gly Val His Ser Asn Pro  
 2115 2120 2125  
 Ala Met Gln Asn Met Asn Pro Met Gln Ala Gly Val Gln Arg Ala Gly  
 2130 2135 2140  
 Leu Pro Gln Gln Gln Pro Gln Gln Gln Leu Gln Pro Pro Met Gly Gly  
 2145 2150 2155 2160  
 60 Met Ser Pro Gln Ala Gln Gln Met Asn Met Asn His Asn Thr Met Pro  
 2165 2170 2175  
 Ser Gln Phe Arg Asp Ile Leu Arg Arg Gln Gln Met Met Gln Gln Gln  
 2180 2185 2190  
 Gln Gln Gln Gly Ala Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Met Ala Asn His

65

ES 2 332 822 T3

2195 2200 2205  
 Asn Gln Phe Gln Gln Pro Gln Gly Val Gly Tyr Pro Pro Gln Pro Gln  
 2210 2215 2220  
 Gln Arg Met Gln His His Met Gln Gln Met Gln Gln Gly Asn Met Gly  
 5 2225 2230 2235 2240  
 Gln Ile Gly Gln Leu Pro Gln Ala Leu Gly Ala Glu Ala Gly Ala Ser  
 2245 2250 2255  
 Leu Gln Ala Tyr Gln Gln Arg Leu Leu Gln Gln Gln Met Gly Ser Pro  
 2260 2265 2270  
 Val Gln Pro Asn Pro Met Ser Pro Gln Gln His Met Leu Pro Asn Gln  
 10 2275 2280 2285  
 Ala Gln Ser Pro His Leu Gln Gly Gln Gln Ile Pro Asn Ser Leu Ser  
 2290 2295 2300  
 Asn Gln Val Arg Ser Pro Gln Pro Val Pro Ser Pro Arg Pro Gln Ser  
 15 2305 2310 2315 2320  
 Gln Pro Pro His Ser Ser Pro Ser Pro Arg Met Gln Pro Gln Pro Ser  
 2325 2330 2335  
 Pro His His Val Ser Pro Gln Thr Ser Ser Pro His Pro Gly Leu Val  
 2340 2345 2350  
 Ala Ala Gln Ala Asn Pro Met Glu Gln Gly His Phe Ala Ser Pro Asp  
 20 2355 2360 2365  
 Gln Asn Ser Met Leu Ser Gln Leu Ala Ser Asn Pro Gly Met Ala Asn  
 2370 2375 2380  
 Leu His Gly Ala Ser Ala Thr Asp Leu Gly Leu Ser Thr Asp Asn Ser  
 2385 2390 2395 2400  
 25 Asp Leu Asn Ser Asn Leu Ser Gln Ser Thr Leu Asp Ile His  
 2405 2410

<210> 3

<211> 781

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

35 Met Ala Thr Gln Ala Asp Leu Met Glu Leu Asp Met Ala Met Glu Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp Gln Gln Gln Ser Tyr Leu Asp  
 20 25 30  
 40 Ser Gly Ile His Ser Gly Ala Thr Thr Ala Pro Ser Leu Ser Gly  
 35 40 45  
 Lys Gly Asn Pro Glu Glu Glu Asp Val Asp Thr Ser Gln Val Leu Tyr  
 50 55 60  
 Gln Trp Glu Gln Gly Phe Ser Gln Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Ala  
 45 65 70 75 80  
 Asp Ile Asp Gly Gln Tyr Ala Met Thr Arg Ala Gln Arg Val Arg Ala  
 85 90 95  
 Ala Met Phe Pro Glu Thr Leu Asp Glu Gly Met Gln Ile Pro Ser Thr  
 100 105 110  
 50 Gln Phe Asp Ala Ala His Pro Thr Asn Val Gln Arg Leu Ala Glu Pro  
 115 120 125  
 Ser Gln Met Leu Lys His Ala Val Val Asn Leu Ile Asn Tyr Gln Asp  
 130 135 140  
 55 Asp Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Thr Lys Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Asp Glu Asp Gln Val Val Val Asn Lys Ala Ala Val Met Val His  
 165 170 175  
 Gln Leu Ser Lys Lys Glu Ala Ser Arg His Ala Ile Met Arg Ser Pro  
 180 185 190  
 60 Gln Met Val Ser Ala Ile Val Arg Thr Met Gln Asn Thr Asn Asp Val  
 195 200 205  
 Glu Thr Ala Arg Cys Thr Ala Gly Thr Leu His Asn Leu Ser His His  
 210 215 220  
 65 Arg Glu Gly Leu Leu Ala Ile Phe Lys Ser Gly Gly Ile Pro Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Val Lys Met Leu Gly Ser Pro Val Asp Ser Val Leu Phe Tyr Ala Ile  
 245 250 255  
 Thr Thr Leu His Asn Leu Leu Leu His Gln Glu Gly Ala Lys Met Ala

ES 2 332 822 T3

				260					265				270			
	Val	Arg	Leu	Ala	Gly	Gly	Leu	Gln	Lys	Met	Val	Ala	Leu	Leu	Asn	Lys
			275					280					285			
	Thr	Asn	Val	Lys	Phe	Leu	Ala	Ile	Thr	Thr	Asp	Cys	Leu	Gln	Ile	Leu
5			290				295					300				
	Ala	Tyr	Gly	Asn	Gln	Glu	Ser	Lys	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Ser	Gly	Gly
	305					310					315					320
	Pro	Gln	Ala	Leu	Val	Asn	Ile	Met	Arg	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Lys	Leu
					325					330					335	
10	Leu	Trp	Thr	Thr	Ser	Arg	Val	Leu	Lys	Val	Leu	Ser	Val	Cys	Ser	Ser
				340					345					350		
	Asn	Lys	Pro	Ala	Ile	Val	Glu	Ala	Gly	Gly	Met	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu
			355					360					365			
	His	Leu	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Arg	Leu	Val	Gln	Asn	Cys	Leu	Trp	Thr
			370				375					380				
15	Leu	Arg	Asn	Leu	Ser	Asp	Ala	Ala	Thr	Lys	Gln	Glu	Gly	Met	Glu	Gly
	385					390					395					400
	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Val	Gln	Leu	Leu	Gly	Ser	Asp	Asp	Ile	Asn	Val
					405					410					415	
20	Val	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Ile	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Cys	Asn	Asn	Tyr
				420					425					430		
	Lys	Asn	Lys	Met	Met	Val	Cys	Gln	Val	Gly	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Val
			435					440					445			
	Arg	Thr	Val	Leu	Arg	Ala	Gly	Asp	Arg	Glu	Asp	Ile	Thr	Glu	Pro	Ala
							455					460				
25	Ile	Cys	Ala	Leu	Arg	His	Leu	Thr	Ser	Arg	His	Gln	Glu	Ala	Glu	Met
	465					470					475					480
	Ala	Gln	Asn	Ala	Val	Arg	Leu	His	Tyr	Gly	Leu	Pro	Val	Val	Val	Lys
					485					490					495	
	Leu	Leu	His	Pro	Pro	Ser	His	Trp	Pro	Leu	Ile	Lys	Ala	Thr	Val	Gly
				500					505					510		
30	Leu	Ile	Arg	Asn	Leu	Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Asn	His	Ala	Pro	Leu	Arg
			515					520					525			
	Glu	Gln	Gly	Ala	Ile	Pro	Arg	Leu	Val	Gln	Leu	Leu	Val	Arg	Ala	His
							535					540				
	Gln	Asp	Thr	Gln	Arg	Arg	Thr	Ser	Met	Gly	Gly	Thr	Gln	Gln	Gln	Phe
35	545					550					555					560
	Val	Glu	Gly	Val	Arg	Met	Glu	Glu	Ile	Val	Glu	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala
					565					570					575	
	Leu	His	Ile	Leu	Ala	Arg	Asp	Val	His	Asn	Arg	Ile	Val	Ile	Arg	Gly
				580					585					590		
40	Leu	Asn	Thr	Ile	Pro	Leu	Phe	Val	Gln	Leu	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Glu
			595					600					605			
	Asn	Ile	Gln	Arg	Val	Ala	Ala	Gly	Val	Leu	Cys	Glu	Leu	Ala	Gln	Asp
							615					620				
	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala	Ile	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Thr	Ala	Pro	Leu
	625					630					635					640
45	Thr	Glu	Leu	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Glu	Gly	Val	Ala	Thr	Tyr	Ala	Ala
					645					650					655	
	Ala	Val	Leu	Phe	Arg	Met	Ser	Glu	Asp	Lys	Pro	Gln	Asp	Tyr	Lys	Lys
				660					665					670		
50	Arg	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	Thr	Ser	Ser	Leu	Phe	Arg	Thr	Glu	Pro	Met
			675					680					685			
	Ala	Trp	Asn	Glu	Thr	Ala	Asp	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Gly	Ala	Gln	Gly
							695					700				
	Glu	Pro	Leu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Asp	Asp	Pro	Ser	Tyr	Arg	Ser	Phe	His
	705					710					715					720
55	Ser	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gln	Asp	Ala	Leu	Gly	Met	Asp	Pro	Met	Met	Glu
					725					730					735	
	His	Glu	Met	Gly	Gly	His	His	Pro	Gly	Ala	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Gly
				740					745					750		
60	Leu	Pro	Asp	Leu	Gly	His	Ala	Gln	Asp	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Pro	Pro
			755					760					765			
	Gly	Asp	Ser	Asn	Gln	Leu	Ala	Trp	Phe	Asp	Thr	Asp	Leu			
							775					780				

<210> 4

<211> 745

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

## ES 2 332 822 T3

&lt;400&gt; 4

5 Met Glu Val Met Asn Leu Met Glu Gln Pro Ile Lys Val Thr Glu Trp  
 1 Gln Gln Thr Tyr Thr Tyr Asp Ser Gly Ile His Ser Gly Ala Asn Thr  
 5 20  
 Cys Val Pro Ser Val Ser Ser Lys Gly Ile Met Glu Glu Asp Glu Ala  
 35 40  
 10 Cys Gly Arg Gln Tyr Thr Leu Lys Lys Thr Thr Thr Tyr Thr Gln Gly  
 50 55  
 Val Pro Pro Ser Gln Gly Asp Leu Glu Tyr Gln Met Ser Thr Thr Ala  
 65 70 80  
 Arg Ala Lys Arg Val Arg Glu Ala Met Cys Pro Gly Val Ser Gly Glu  
 85 90 95  
 15 Asp Ser Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gln Val Glu Gly Gln Ala Thr Asn  
 100 105 110  
 Leu Gln Arg Leu Ala Glu Pro Ser Gln Leu Leu Lys Ser Ala Ile Val  
 115 120 125  
 20 His Leu Ile Asn Tyr Gln Asp Asp Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ala Leu  
 130 135 140  
 Pro Glu Leu Thr Lys Leu Leu Asn Asp Glu Asp Pro Val Val Val Thr  
 145 150 160  
 Lys Ala Ala Met Ile Val Asn Gln Leu Ser Lys Lys Glu Ala Ser Arg  
 165 170 175  
 25 Arg Ala Leu Met Gly Ser Pro Gln Leu Val Ala Ala Val Val Arg Thr  
 180 185 190  
 Met Gln Asn Thr Ser Asp Leu Asp Thr Ala Arg Cys Thr Thr Ser Ile  
 195 200 205  
 30 Leu His Asn Leu Ser His His Arg Glu Gly Leu Leu Ala Ile Phe Lys  
 210 215 220  
 Ser Gly Gly Ile Pro Ala Leu Val Arg Met Leu Ser Ser Pro Val Glu  
 225 230 235 240  
 Ser Val Leu Phe Tyr Ala Ile Thr Thr Leu His Asn Leu Leu Leu Tyr  
 245 250 255  
 35 Gln Glu Gly Ala Lys Met Ala Val Arg Leu Ala Asp Gly Leu Gln Lys  
 260 265 270  
 Met Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Asn Pro Lys Phe Leu Ala Ile Thr  
 275 280 285  
 40 Thr Asp Cys Leu Gln Leu Leu Ala Tyr Gly Asn Gln Glu Ser Lys Leu  
 290 295 300  
 Ile Ile Leu Ala Asn Gly Gly Pro Gln Ala Leu Val Gln Ile Met Arg  
 305 310 315 320  
 Asn Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu Leu Trp Thr Thr Ser Arg Val Leu Lys  
 325 330 335  
 45 Val Leu Ser Val Cys Pro Ser Asn Lys Pro Ala Ile Val Glu Ala Gly  
 340 345 350  
 Gly Met Gln Ala Leu Gly Lys His Leu Thr Ser Asn Ser Pro Arg Leu  
 355 360 365  
 Val Gln Asn Cys Leu Trp Thr Leu Arg Asn Leu Ser Asp Val Ala Thr  
 370 375 380  
 50 Lys Gln Gln Gly Leu Glu Ser Val Leu Lys Ile Leu Val Asn Gln Leu  
 385 390 395 400  
 Ser Val Asp Asp Val Asn Val Leu Thr Cys Ala Thr Gly Thr Leu Ser  
 405 410 415  
 55 Asn Leu Thr Cys Asn Asn Ser Lys Asn Lys Thr Leu Val Thr Gln Asn  
 420 425 430  
 Ser Gly Val Glu Ala Leu Ile His Ala Ile Leu Arg Ala Gly Asp Lys  
 435 440 445  
 Asp Asp Ile Thr Glu Pro Ala Val Cys Ala Leu Arg His Leu Thr Ser  
 450 455 460  
 60 Arg His Pro Glu Ala Glu Met Ala Gln Asn Ser Val Arg Leu Asn Tyr  
 465 470 475 480  
 Gly Ile Pro Ala Ile Val Lys Leu Leu Asn Gln Pro Asn Gln Trp Pro  
 485 490 495  
 65 Leu Val Lys Ala Thr Ile Gly Leu Ile Arg Asn Leu Ala Leu Cys Pro

ES 2 332 822 T3

			500					505				510				
	Ala	Asn	His	Ala	Pro	Leu	Gln	Glu	Ala	Ala	Val	Ile	Pro	Arg	Leu	Val
			515					520					525			
5	Gln	Leu	Leu	Val	Lys	Ala	His	Gln	Asp	Ala	Gln	Arg	His	Val	Ala	Ala
		530					535					540				
	Gly	Thr	Gln	Gln	Pro	Tyr	Thr	Asp	Gly	Val	Arg	Met	Glu	Glu	Ile	Val
	545					550					555					560
	Glu	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Leu	His	Ile	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Met	Asn
					565					570					575	
10	Arg	Met	Glu	Ile	Phe	Arg	Leu	Asn	Thr	Ile	Pro	Leu	Phe	Val	Gln	Leu
				580					585					590		
	Leu	Tyr	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ile	Gln	Arg	Val	Ala	Ala	Gly	Val	Leu
			595					600					605			
15	Cys	Glu	Leu	Ala	Gln	Asp	Lys	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Ile	Asp	Ala	Glu
		610					615					620				
	Gly	Ala	Ser	Ala	Pro	Leu	Met	Glu	Leu	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Glu	Gly
	625					630					635					640
	Thr	Ala	Thr	Tyr	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Phe	Arg	Ile	Ser	Glu	Asp	Lys
				645						650					655	
20	Asn	Pro	Asp	Tyr	Arg	Lys	Arg	Val	Ser	Val	Glu	Leu	Thr	Asn	Ser	Leu
				660					665					670		
	Phe	Lys	His	Asp	Pro	Ala	Ala	Trp	Glu	Ala	Ala	Gln	Ser	Met	Ile	Pro
			675					680					685			
25	Ile	Asn	Glu	Pro	Tyr	Gly	Asp	Asp	Met	Asp	Ala	Thr	Tyr	Arg	Pro	Met
		690					695					700				
	Tyr	Ser	Ser	Asp	Val	Pro	Leu	Asp	Pro	Leu	Glu	Met	His	Met	Asp	Met
	705					710					715					720
	Asp	Gly	Asp	Tyr	Pro	Ile	Asp	Thr	Tyr	Ser	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Pro
				725						730					735	
30	Tyr	Pro	Thr	Ala	Asp	His	Met	Leu	Ala							
			740						745							

<210> 5

35 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 5

45 agggctctgct actgagatgc tctg

24

<210> 6

50 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 6

60 caaccactgg ttttctgcc accg

24

<210> 7

65 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

## ES 2 332 822 T3

	<220>		
	<223> oligonucleótido		
5	<400> 7		
	ggtgaaggtc ggtgtgaacg ga		22
10	<210> 8		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> oligonucleótido		
20	<400> 8		
	tgttagtggg gtctcgctcc tg		22
25	<210> 9		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> oligonucleótido		
35	<400> 9		
	ggcgttctct ttggaaaggt gttc		24
40	<210> 10		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> oligonucleótido		
50	<400> 10		
	ctcgaaccac atccttctct		20
55	<210> 11		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
60	<220>		
	<223> oligonucleótido		
65	<400> 11		
	gtcttatcga tgctggagtg		20

## ES 2 332 822 T3

	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
10	<400> 12	
	aaagctcttc tcgcagccat	20
15	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
25	<400> 13	
	gcatgtccta ctgcagcag	20
30	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
40	<400> 14	
	gctgatcatg tcccgaggt	20
45	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
55	<400> 15	
	accaacagca actatgacct c	21
60	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

## ES 2 332 822 T3

	<220>	
	<223> oligonucleótido	
5	<400> 16	
	aaggacgtag cgaccgcaac	20
10	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> oligonucleótido	
20	<400> 17	
	tgcttatgga tcccagagtg a	21
25	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> oligonucleótido	
35	<400> 18	
	ttggtgagga tctctccgcg t	21
40		
45		
50		
55		
60		
65		