



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 786**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0735 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04740821 .6**
96 Fecha de presentación : **08.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1644485**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Proteínas secretadas como marcadores para la diferenciación celular.**

30 Prioridad: **08.07.2003 EP 03015400**
08.07.2003 US 485462 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2011

73 Titular/es: **AXIOGENESIS AG.**
Nattermannallee 1, Gebäude S20
50829 Köln, DE

72 Inventor/es: **Ehlich, Andreas;**
Bohlen, Heribert y
Schwengberg, Silke

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 365 786 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

Proteínas secretadas como marcadores para la diferenciación celular

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de proteínas capaces de ser secretadas a través de la membrana celular como informadores específicos según el tipo celular durante el desarrollo celular. Más detalladamente, la presente invención se refiere a células madre embrionarias (ES) transfectadas con un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína secretada que se une de forma específica a un promotor dependiente de la célula y/o del desarrollo; un método para preparar dichas células ES; un cultivo celular que puede obtenerse cultivando dichas células ES; un método para el análisis toxicológico de sustancias usando dichos cultivos celulares, así como a métodos para la identificación de factores de diferenciación y crecimiento para la inducción de células selectivamente diferenciadas que pueden usarse como fuente para injertos de tejidos; un método para producir mamíferos no humanos transgénicos usando dichas células ES; un mamífero no humano transgénico que puede obtenerse mediante dicho método; y a un método para examinar las etapas de desarrollo celular usando células de dicho mamífero no humano. La presente invención también se refiere a análisis para identificar condiciones de cultivo y a las sustancias que promueven la diferenciación en el tipo celular deseado, o para determinar la toxicidad de un compuesto en ciertos tipos celulares. Dichos análisis son especialmente adecuados como indicadores de posibles trastornos en el desarrollo y diferenciación durante la embriogénesis.

Técnica anterior

Las células precursoras se han convertido en objeto de interés en la investigación médica. Por una parte, los precursores pueden reemplazar las células senescentes o dañadas por heridas o enfermedades y, por otra parte, estas células representan un modelo ideal para estudiar el desarrollo y diferenciación y los factores que influyen dichos procesos. El uso de líneas celulares convencionales en estos estudios presentan el inconveniente de que las líneas celulares individuales pueden no ser totalmente representativas de las complejas características biológicas de un organismo intacto. Además, incluso repitiendo los análisis en múltiples líneas celulares, no se reproducen o explican las complejas interacciones entre células y tejido que tienen lugar en un organismo.

Esta es la razón principal por la cual el análisis de toxicidad en las líneas celulares no puede reemplazar los análisis convencionales en animales. Continuamente se están desarrollando y ensayando sobre animales nuevos compuestos químicos. Además de los compuestos químicos de uso industrial y doméstico, cada año se desarrollan diferentes sustancias químicas para usar como medicamentos. La administración de medicamentos y alimentos de los EE.UU. (FDA) promulga normas relativas al análisis de fármacos potenciales que actualmente exigen llevar a cabo análisis muy completos de toxicidad, capacidad mutagénica y otros efectos en, al menos, dos especies antes de que una sustancia prevista como posible medicamento pueda acceder a la realización de análisis clínicos en humanos. La realización de análisis de toxicidad preclínicos cuesta varios cientos de miles de dólares. A pesar de esta enorme inversión, casi una tercera parte de todas las sustancias terapéuticas candidatas para el uso en humanos no superan la primera fase de los análisis clínicos en humanos debido a que presentan una toxicidad no prevista. Está claro que los análisis exhaustivos de evaluación toxicológica disponibles en la actualidad no detectan todos los efectos tóxicos asociados con la terapia en humanos o con la exposición a sustancias químicas presentes en el entorno. La disponibilidad de mejores medios de evaluación exhaustiva de sustancias candidatas a uso terapéutico o sustancias químicas en general para determinar su posible toxicidad reduciría el coste e incertidumbre relacionados con el desarrollo de nuevas sustancias terapéuticas y materiales, por ejemplo, para el uso en dispositivos médicos o en otros dispositivos o productos de consumo a los cuales están expuestos los seres humanos diariamente.

La detección de las propiedades teratogénicas y/o embriotóxicas de los agentes químicos se lleva a cabo en la actualidad mediante la determinación de la toxicidad reproductiva de sustancias sometidas a análisis tras ser administradas en dosis únicas o múltiples a mamíferos de laboratorio en estado de gestación y mediante análisis de la toxicidad embrionaria en las etapas iniciales de la gestación. Además, se realizan análisis in vitro con embriones de mamíferos (Neubert y Merker, de Gruyter, Berlin-Nueva York (1981)) y con órganos embrionarios para análisis de teratogenicidad. Estos procedimientos de análisis presentan, sin embargo, el inconveniente de que requieren el uso de una gran cantidad de mamíferos vivos, especialmente de ratas y ratones. Los procedimientos para análisis in vitro en los que se emplean principalmente cultivos celulares de yemas de extremidades (por ejemplo, "Limb Buds", Kochhar, Teratology 11 (1975), 273-287), o partes del cerebro de ratas embrionarias (Flint y Orton, Toxicol. Appl. Pharmacol. 45 76 (1984), 383-395) o líneas celulares estables de tejido de mamífero embrionario o adulto como, por ejemplo, células tumorales del ovario o células palatales embrionarias no satisfacen, en sentido estricto, los

requerimientos que se imponen a los análisis de teratogenicidad durante la embriogénesis, ofreciendo indicios de posible disgénesis o trastornos en el desarrollo.

Se han realizado esfuerzos durante unos años para emplear cultivos permanentes de células madre embrionarias (células ES) para la detección de sustancias embriotóxicas y mutagénicas; véase, p. ej., Laschinski y col., *Reproductive Toxicol.* 5 (1991), 57-65; Newall y Beedles, *Toxicol. in Vitro* 8 (1994), 697-701; Sehlmeier y Wobus, *Mutation Res.* 324(1994), 69-76.

Todos estos sistemas hacen uso de las propiedades biológicas de las células ES de análisis o de un sistema reportero que ha sido introducido en las células.

Por ejemplo, US-A-6.498.018 describe un método para determinar el efecto de un agente biológico poniendo en contacto un cultivo celular con un agente biológico. El cultivo celular contiene células madre neuronales del sistema nervioso central (SNC) multipotentes humanas obtenidas de tejido neural del SNC primario y un medio de cultivo con factores de crecimiento previamente seleccionados. La lectura de salida se proporciona mediante el efecto de un agente biológico en presencia o en ausencia de una función o propiedad biológica que puede atribuirse al cultivo celular. Un inconveniente importante de este sistema es el hecho de que resulta difícil medir funciones o propiedades biológicas específicas inherentes a un determinado cultivo de células y, a menudo, supone la destrucción de una gran parte del cultivo para obtener suficiente material para el análisis.

WO02/086073 describe un método para la selección positiva de células neuronales diferenciadas a partir de células madre embrionarias obtenidas por transferencia nuclear aprovechando la nectina como marcador de células madre neurales. Este método se limita a tipos celulares neuronales que expresan nectina de modo natural. US-A-6.007.993 describe un procedimiento de análisis in vitro para la detección de efectos embriotóxicos (por ejemplo, teratogénicos) químicamente inducidos basados en células madre (ES) embrionarias pluripotentes diferenciadas de ratón y de rata, usando células embrionarias germinales (EG) establecidas a partir de células germinales primordiales. Se construyen clones estables de células madre ES o EG transgénicos en donde un gen informador bacteriano, LacZ o el gen luciferasa, se pone bajo el control de promotores específicos para un tejido determinado o genes de control del desarrollo. Después de la diferenciación de las células ES en presencia de sustancias teratogénicas en los diferentes derivados de ruta de germinación se produce una expresión dependiente de la diferenciación en las células, debido a la actividad de los promotores específicos para el tejido. La activación, represión o modulación de estos genes específicos de tejido se detecta a partir de una reacción que depende del gen informador empleado, por ejemplo, el análisis X-Gal.

Wobus y col., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29 (1997), 1525-1539 describe un método para el seguimiento de la diferenciación celular incluyendo el cultivo de células madre embrionarias (ES) capaces de diferenciarse y formar cuerpos embrioides que contienen una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un gen informador que codifica el gen lacZ bajo el control de la región promotora MLC-2v en donde la cantidad de actividad del producto génico lacZ se usa para realizar el seguimiento de la diferenciación de las células en presencia de ácido retinoico.

WO99/01552 describe células madre embrionarias (ES) que son transfectadas de modo estable con un constructo de ADN que codifica una proteína fluorescente que no produce daños a las células y se une de forma operativa a un promotor dependiente del desarrollo o del tipo celular. También se describe un método para el seguimiento toxicológico de sustancias usando estos cultivos celulares de ES.

Aunque los métodos descritos anteriormente emplean análisis semicuantitativos, así como análisis relativamente sencillos y robustos, dichos análisis suponen habitualmente la destrucción de las células ensayadas. La preparación del lisado celular que se requiere en muchos de los análisis convencionales descritos produce una elevada variabilidad dentro de un mismo análisis y entre análisis diferentes. Para mediciones repetidas durante el curso de la diferenciación, deben ensayarse muchos cultivos paralelos con los problemas de variabilidad que eso conlleva. La preparación laboriosa de los lisados también hace que el análisis sea menos apto para llevarse a cabo en formatos de alto rendimiento. El uso de proteínas mensajeras fluorescentes puede eliminar algunos de estos problemas. Sin embargo, la expresión de proteína verde fluorescente (GFP) ya ha mostrado algunos efectos tóxicos (Liu y col. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 260 (1999), 712-717). Otro inconveniente es la autofluorescencia de productos agregados de células ES (cuerpos embrioides) que proporciona una elevada cantidad de ruido de fondo en las mediciones de fluorescencia.

El problema técnico de realizar fácilmente el seguimiento de las células que se diferencian en un determinado tipo celular y proporcionar de ese modo un sistema de análisis fiable y altamente sensible para la evaluación exhaustiva

de la toxicidad, agentes promotores de la diferenciación y/o condiciones de cultivo apropiadas y suplementos para el medio, se soluciona proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y que se describen más adelante en la presente memoria.

5 Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a un método de seguimiento de la diferenciación celular que comprende cultivar células capaces de diferenciarse en al menos un tipo celular particular en donde dichas células contienen al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un gen informador que codifica un producto que se ha segregado tras la diferenciación celular, bajo condiciones que permiten la diferenciación de las células, o mantener un animal no humano que comprende dichas células bajo condiciones adecuadas; y determinar la cantidad de actividad o cantidad del producto génico informador en un fluido corporal de dicho animal no humano transgénico o en el medio de cultivo celular o muestra del mismo.

La presente invención también se refiere a los constructos génicos informadores mencionados para el seguimiento de la diferenciación celular, así como a células, agregados de al menos un tipo celular, tejido que comprende dichas células o agregados, órganos que comprenden dichas células o tejidos, implantes o trasplantes que comprenden dicho órgano, los cuales se caracterizan todos por que comprenden un constructo génico informador de dichas características.

Además, la presente invención se refiere a un animal no humano y a una composición de material caracterizado que comprende un constructo génico codificador, una célula, un agregado celular, un tejido y/o un órgano descrito en la presente memoria.

Además, la presente invención se refiere a un array o chip que contiene las células, los agregados celulares o tejido de la invención unido a un soporte sólido o suspendido sobre el mismo, así como a un equipo para analizar dicho array o chip.

Específicamente, la presente invención se refiere a sistemas de análisis para identificar sustancias que influyen la diferenciación celular en determinados tipos celulares. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para obtener y/o perfilar un modulador de diferenciación celular. Este método comprende poner en contacto una muestra de análisis que contiene una célula, un agregado celular, tejido, órgano o un animal transgénico no humano según se define anteriormente en la presente memoria con la sustancia para someter a análisis; y, a continuación, determinar el efecto de la sustancia de análisis sobre la cantidad de producto génico informador o actividad en comparación con una muestra o animal de control.

El sistema de análisis proporcionado por la presente invención es útil para propósitos de evaluación exhaustiva de medicamentos. Se prevé obtener y fabricar medicamentos que favorezcan o inhiban la formación de dichos tipos celulares específicos usando el método descrito anteriormente en la presente memoria, siendo el aumento o disminución de la actividad del gen informador un indicador para el medicamento. Un nivel aumentado o reducido de la actividad del producto génico informador, respectivamente, puede también ser un indicador de un agente o compuesto que favorece la curación de heridas y/o la curación de tejido dañado o de toxicidad de compuestos, respectivamente.

La presente invención se refiere además a un kit útil para llevar a cabo los métodos descritos anteriormente en la presente memoria que contiene, por ejemplo, un constructo génico informador y/o una célula según se ha definido anteriormente en la presente memoria, y compuestos estándar como, por ejemplo, medios de cultivo celular, agentes de selección, agentes de detección para la molécula mensajera y muestras de control.

Además, se describen métodos para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de medicamentos y/o una diana para descubrir productos candidatos a fármacos. Ambos métodos incluyen proporcionar uno o más sistemas de análisis descritos anteriormente en la presente memoria para la identificación de moduladores de diferenciación celular; y/o llevar a cabo perfilado terapéutico de los moduladores identificados, u otros análogos de los mismos, en términos de eficacia y toxicidad en los animales transgénicos proporcionados por la presente invención. Los moduladores identificados usando los métodos proporcionados por la presente invención se formulan posteriormente en una composición farmacéutica o se vende la licencia de los mismos a una tercera parte para el desarrollo y/o comercialización posteriores.

La presente invención también se refiere a moduladores de la diferenciación celular que se han identificado usando los métodos de la presente invención, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos moduladores para usar en la modulación de la diferenciación celular y el tratamiento de las enfermedades

correspondientes.

Además, la presente invención se refiere al uso de un constructo génico informador, una célula, un agregado celular, tejido, órgano, implante o trasplante, un animal no humano, una composición, un array o un equipo proporcionados según la presente invención en el descubrimiento de medicamentos, perfilado farmacocinético o farmacológico.

Breve descripción de la figura:

Figura 1: expresión de 25SEAP debida al promotor con especificidad cardíaca α MHC de células ES diferenciadas en presencia de ácido retinoico. Se diferenciaron células madre transfectadas con el vector α -MHC-SEAP (que contenía el gen SEAP bajo control del promotor con especificidad cardíaca α MHC) en presencia de ácido holo-trans-retinoico a las concentraciones indicadas. Al cabo de 13 días, los sobrenadantes del cultivo se sometieron a análisis para determinar la actividad de SEAP. Se muestran los valores medios de las muestras por duplicado de los cuales se substrajo el ruido de fondo de la actividad de SEAP. Las actividades se expresan como porcentaje de la actividad de SEAP en muestras que contenían únicamente disolvente (dimetilsulfóxido), sin ácido retinoico.

Definiciones

Para los propósitos de esta memoria descriptiva, el término "célula madre" puede referirse tanto a una célula madre como a una célula germinal, por ejemplo, célula madre embrionaria (ES) y célula germinal embrionaria (EG), respectivamente. Mínimamente, una célula madre tiene la capacidad de proliferar y formar células de más de un fenotipo diferente, y también es capaz de autoregenerarse, tanto como parte del mismo cultivo como cuando se cultiva en condiciones diferentes. Las células madre embrionarias son también de forma típica telomerasa-positivas y positivas para OCT-4. La actividad de la telomerasa puede determinarse usando un análisis de actividad TRAP (Kim y col., Science 266 (1997), 2011), usando un kit comercial disponible (kit de detección de telomerasa TRAPeze(R) XK, Cat. s7707; Intergen Co., Purchase N.Y.; o 40 TeloTAGGG(TM) Telomerase PCR ELISAPlus, Cat. 2.013.89; Roche Diagnostics, Indianapolis). La expresión de hTERT puede evaluarse también al nivel de ARNm mediante RT-PCR. El kit de cuantificación de hTERT LightCycler TeloTAGGG(TM) (Cat. 3.012.344; Roche Diagnostics) se comercializa para fines de investigación.

Según la presente invención, el término célula madre embrionaria (ES) incluye cualquier célula madre multipotente o pluripotente derivada de tejido pre-embrionario, embrionario o fetal en cualquier momento posterior a la fertilización y que tiene la característica de ser capaz, bajo las condiciones adecuadas, de producir progenia de varios tipos celulares diferentes que son derivados de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), según un análisis estándar aceptado en la técnica como, por ejemplo, la capacidad para formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas.

"Células embrionarias germinales" o "células EG" son células derivadas de células germinales primordiales. El término "célula embrionaria germinal" se usa para describir células de la presente invención que presentan un fenotipo celular pluripotente embrionario. Los términos "célula embrionaria germinal (EG) humana" o "célula embrionaria germinal" pueden usarse indistintamente en la presente memoria para describir células de mamífero, preferiblemente humanas, o líneas celulares de las mismas, de la presente invención, que presentan un fenotipo celular madre embrionario pluripotente según se define en la presente memoria. Por lo tanto, las células embrionarias germinales son capaces de diferenciación en células de capas germinales ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. Las células EG pueden también caracterizarse por la presencia o ausencia de marcadores asociados con sitios epítomos identificados mediante la unión de anticuerpos particulares y la ausencia de determinados marcadores según se identifica por la falta de unión de determinados anticuerpos.

"Pluripotente" se refiere a células que mantienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en una amplia gama de linajes celulares, incluida la línea germinal. Los términos "fenotipo celular madre embrionario" y "célula de tipo madre embrionaria" también se usan de forma indistinta en la presente memoria para describir células indiferenciadas y que, por lo tanto, son pluripotentes.

En la definición de células ES se incluyen células embrionarias de diversos tipos, por ejemplo, las células madre embrionarias de humanos descritas por Thomson y col. (Science 282 (1998), 1145); las células madre embrionarias de otros primates, por ejemplo, células madre rhesus (Thomson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7844), células madre de tití (Thomson y col., Biol. Reprod. 55 (1996), 254) y células germinales embrionarias humanas (hEC) (Shambloott y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), 13726). En el término se incluyen también otros tipos celulares pluripotentes. Se incluyen células de origen mamífero cualesquiera capaces de producir progenia que son derivados de las tres capas germinales, independientemente de si se obtuvieron a partir de tejido embrionario, tejido

fetal u otras fuentes. Las células madre empleadas según la presente invención son, preferiblemente (pero no siempre de forma necesaria), cariotípicamente normales. Sin embargo, es preferible no usar células ES derivadas de una fuente maligna.

5 “Células alimentadoras” o “nodrizas” son términos usados para describir células de un tipo que se cultivan junto con células de otro tipo para proporcionar un entorno en el que puedan crecer las células del segundo tipo. Las células alimentadoras son opcionalmente de una especie diferente a la de las células que están sustentando. Por ejemplo, determinados tipos celulares ES pueden ser sustentados por fibroblastos embrionarios de ratón primarios (como, por ejemplo, células STO murinas, p. ej., Martin y Evans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975), 1441-1445), o células de tipo fibroblasto humanas diferenciadas de células ES humanas, según se describe posteriormente en esta memoria descriptiva. El término “célula STO” se refiere a células de ratón de tipo fibroblasto embrionarias tal y como se comercializan e incluyen las depositadas como ATCC CRL 1503.

15 El término “cuerpos embrionarios” (EB) es un término de la técnica sinónimo de “cuerpos agregados”. Los términos se refieren a agregados de células diferenciadas e indiferenciadas que aparecen cuando se produce un crecimiento excesivo de células ES en cultivos monocapa, o se mantienen en cultivos en suspensión. Cuerpos embrioides son una mezcla de diferentes tipos celulares, típicamente de varias capas germinales, que pueden distinguirse mediante criterios morfológicos; véase también más adelante en la presente memoria. Según se usa en la presente memoria, “cuerpo embrioide”, “EB” o “células EB”, se refiere típicamente a una estructura morfológica que comprende una población de células, la mayoría de las cuales se obtienen a partir de células madre embrionarias (ES) que han experimentado diferenciación. En condiciones de cultivo adecuadas para la formación de EB (p. ej., la eliminación de factor inhibidor de leucemia u otros factores de bloqueo similares), las células ES proliferan y forman masas pequeñas de células que comienzan a diferenciarse. En la primera fase de la diferenciación, que corresponde habitualmente de forma aproximada a los días 1-4 de la diferenciación en el caso de los humanos, la masa pequeña de células forma una capa de células endodérmicas sobre la capa exterior y se considera un “cuerpo embrioide simple”. En la segunda fase, que habitualmente corresponde de forma aproximada a los días 3-20 posteriores a la diferenciación en el caso de los humanos, se forman “cuerpos embrioides complejos” que se caracterizan por una diferenciación extensiva de células ectodérmicas y mesodérmicas y derivados tisulares. Según se usa en la presente invención, el término “cuerpo embrioide” o “EB” comprende tanto cuerpos embrioides simples como complejos, salvo que el contexto requiera lo contrario. La determinación de cuándo se han formado los cuerpos embrioides en un cultivo de células ES la lleva a cabo de forma habitual por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante inspección visual de la morfología. Se consideran cuerpos embrioides las masas flotantes de aproximadamente 20 células o más; véase, p. ej., Schmitt y col., Genes Dev. 5 (1991), 728-740; Doetschman y col., J. Embryol. Exp. Morph. 87 (1985), 27-45. Se entiende también que el término “cuerpo embrioide”, “EB”, o “células EB”, según se usa en la presente memoria, comprende una población de células, siendo la mayoría de las mismas células pluripotentes capaces de desarrollarse formando linajes celulares diferentes cuando se cultivan bajo las condiciones adecuadas. Según se usa en la presente memoria, dicho término también se refiere a estructuras equivalentes derivadas de células germinales primordiales que son células primitivas extraídas de regiones gonádicas embrionarias; véase, p. ej., Shambloott y col., (1998), mencionada anteriormente en la presente memoria. Las células germinales primordiales, a veces también nombradas en la técnica como células EG o células germinales embrionarias, cuando se tratan con factores apropiados, forman células ES pluripotentes de las cuales pueden obtenerse cuerpos embrionarios; véase, p. ej., la patente estadounidense US-A-5.670.372, Shambloott y col., mencionada anteriormente en la presente memoria.

45 Los términos “polinucleótido” y “molécula de ácido nucleico” se refieren a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud. Se incluyen genes y fragmentos de genes, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN y ARN aislado, sondas de ADN y ARN, y cebadores. Según se usa en esta memoria descriptiva, el término polinucleótidos se refiere de forma indistinta a moléculas de doble hélice y de una sola hélice. Salvo que se indique o requiera lo contrario, cualquier realización de la presente invención que sea un polinucleótido comprende tanto una forma de doble hélice como cada una de las dos formas de hélice simple complementarias conocidas o predichas para conformar la forma de doble hélice. Se incluyen análogos de ácido nucleico como, por ejemplo, fosforamidatos y tiosforamidatos.

55 Se dice que una célula está “genéticamente alterada”, “transfectada” o “genéticamente transformada” cuando se ha transferido un polinucleótido a la célula mediante cualquier medio adecuado de manipulación artificial, o cuando la célula es una progenia de la célula originalmente alterada que ha heredado el polinucleótido. El polinucleótido comprenderá a menudo una secuencia que puede transcribirse que codifica una proteína de interés, lo que permite que la célula exprese la proteína a un nivel elevado. Se dice que la alteración genética es “heredable” si una progenia de la célula alterada presenta la misma alteración.

60

Una "secuencia reguladora" o "secuencia de control" es una secuencia de nucleótidos implicada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido como, por ejemplo, replicación, duplicación, transcripción, ensamblaje, poliadenilación, traslación, o degradación del polinucleótido.

Los elementos de control de la transcripción incluyen promotores, potenciadores, y represores.

5 Secuencias de genes particulares conocidas como promotores, como el promotor de "αMHC" o de "colágeno", son secuencias de polinucleótidos derivadas del gen mencionado que promueven la transcripción de un producto de expresión génica unido de forma operativa. Se reconoce que diversas porciones de la secuencia génica no traducida
10 aguas arriba e intrón pueden contribuir en algunos casos a la actividad del promotor y que la totalidad o segmentos parciales de estas porciones pueden estar presentes en el constructo modificado genéticamente al que se hace mención. El promotor puede estar basado en la secuencia génica de cualquier especie que tenga el gen, salvo que se restrinja de forma explícita, y puede incorporar cualquier adición, sustitución o delección deseable, en medida proporcional a la capacidad de promover la transcripción en el tejido diana. Los constructos genéticos diseñados para el tratamiento de humanos comprenden típicamente un segmento que tiene, al menos, un 90% de similitud con
15 una secuencia de promotor de un gen humano. Una secuencia específica puede someterse a un análisis de actividad y especificidad, por ejemplo, mediante unión operativa con un gen informador; véase la Figura 1.

Según la presente invención, el término "promotor dependiente de la célula y/o del desarrollo" debe entenderse en referencia a un promotor que manifiesta su actividad de promotor solamente en tipos celulares específicos y/o
20 solamente en etapas específicas del desarrollo celular, tanto en cultivos celulares (cuerpos embrioides) como en mamíferos no humanos transgénicos obtenidos a partir de células ES según la presente invención. Además, puede emplearse cualquier promotor con especificidad celular conocido, por ejemplo, para células nerviosas, células cardíacas, neuronas, células gliales, células hematopoyéticas, células endoteliales, células musculares lisas, células musculares esqueléticas, células de cartílagos, fibroblastos y células epiteliales.

25 Se dice que los elementos genéticos están "operativamente unidos" si están en una relación estructural que les permita operar según su función característica. Por ejemplo, si un promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia informador, puede decirse que la secuencia informador está operativamente unida al promotor (o bajo control del mismo). Puede haber una secuencia de intervención entre el promotor y la región codificadora siempre y
30 cuando se mantenga esta relación funcional.

En el contexto de la codificación de secuencias, promotores y otros elementos genéticos, el término "heterólogo" indica que el elemento se obtiene a partir de una entidad genotípicamente diferente de la del resto de la entidad con la cual se está comparando. Por ejemplo, un promotor o gen introducido mediante técnicas de ingeniería genética en
35 un animal de una especie diferente se dice que es un polinucleótido heterólogo. Un elemento genético "endógeno" es un elemento que está situado en el cromosoma en posición idéntica a donde se encuentra de forma natural, aunque puedan introducirse otros elementos de modo artificial en una posición próxima.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma indistinta en esta memoria descriptiva en referencia a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede comprender aminoácidos modificados, puede ser lineal o ramificado, y puede estar interrumpido por ácidos de tipo no amino.

40 Si no se indica lo contrario, los términos "compuesto", "sustancia" y "composición (química)" se usan de forma indistinta en la presente memoria e incluyen, sin limitarse a ello, agentes terapéuticos (o agentes potencialmente terapéuticos), agentes de toxicidad conocida como, por ejemplo, neurotoxinas, toxinas hepáticas, toxinas de células hematopoyéticas, miotoxinas, agentes carcinógenos, teratógenos, ortoxinas para uno o más órganos reproductores. Las composiciones químicas pueden además ser sustancias químicas de uso en agricultura como, por ejemplo, pesticidas, fungicidas, nematocidas y fertilizantes; cosméticos, incluidos los compuestos conocidos como
45 "cosmocéuticos", residuos industriales o subproductos, o contaminantes medioambientales. También pueden ser compuestos terapéuticos para animales o potencialmente terapéuticos para animales.

Los productos industriales que pueden someterse a análisis con los métodos de la presente invención incluyen blanqueantes, pastillas para usar en inodoros, líquidos lavavajillas, jabones en polvo y líquidos, acondicionadores de tejidos, productos de limpieza para ventanas, hornos, suelos, cuartos de baño, cocinas y alfombras, detergentes
50 para lavavajillas y adyuvantes de aclarado, agentes para ablandar el agua, productos de descalcificación, quitamanchas, abrillantadores, productos de tipo aceite, pinturas, productos para eliminar manchas de pintura, colas, disolventes, barnices, productos para refrescar el aire, bolas antipolillas e insecticidas.

Constantemente se están desarrollando nuevos ingredientes para productos para el hogar y es necesario someterlos a análisis. Por ejemplo, en los últimos años se han desarrollado nuevas enzimas (para digerir manchas)

y “abrillantadores ópticos” (que proporcionan a la colada un aspecto más blanco) para usar en polvos y líquidos de lavado de ropa. Se han desarrollado nuevos tensioactivos (que disgregan la grasa para eliminar la suciedad allí atrapada) y “aditivos reforzantes de la detergencia” químicos (que actúan como productos para ablandar el agua y permiten que aumente la eficacia de los tensioactivos) para usar en polvos y líquidos de lavado de ropa, líquidos lavavajillas y diversos agentes de limpieza. Pero también es necesario evaluar los materiales de uso médico, por ejemplo, materiales dentales como, por ejemplo, nuevos polímeros de relleno, aleaciones de metal, y cerámica bioactiva. Además, las composiciones químicas de cualquier parte de un dispositivo como, por ejemplo, catéteres, electrodos, adhesivos, pasta, gel o crema pueden evaluarse con el método de la presente invención en diferentes concentraciones y en presencia de diferentes ingredientes e impurezas.

En la presente memoria, “perfil molecular” o “perfil” de una composición o compuesto químico se refiere a un patrón de alteraciones en la expresión génica o proteica, o en ambas, en una célula ES, cuerpo embriode, tejido, etc., en contacto con la composición química en comparación con una célula, cuerpo embriode o tejido similar en contacto solamente con medio de cultivo.

Descripción detallada

Células madre de diversas clases se han convertido en una modalidad muy atractiva en la medicina regenerativa. Pueden hacerse proliferar en cultivo y después diferenciarse in vitro o in situ en los tipos celulares necesarios. Esta plasticidad les convierte en modelos ideales para análisis de toxicidad, así como para la investigación de fármacos como, por ejemplo, factores de promoción específicos para los tejidos. Especialmente, los cuerpos embrioides que constan de diferentes tipos celulares de las capas germinales que interaccionan entre sí proporcionan un sistema de evaluación muy sensible. La capacidad de las células madre para diferenciarse en tipos celulares diferentes en presencia de la sustancia de análisis puede depender de la capacidad de la sustancia para promover la diferenciación y/o la toxicidad de dicha sustancia.

El método de seguimiento de la diferenciación celular según la presente invención comprende:

- transfectar células capaces de diferenciarse en, al menos, un tipo celular específico con, al menos, una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un gen informador que codifica un producto que se secreta tras la diferenciación;
- introducir las células en un animal no humano o cultivar las células bajo condiciones que permitan la diferenciación de las células; y
- determinar la cantidad de actividad del producto génico informador en un fluido corporal de dicho animal no humano transgénico o en el medio de cultivo celular.

La presente invención se basa en el uso de un gen informador secretado. Sorprendentemente, se descubrió que las moléculas marcadoras secretadas tienen ciertas ventajas frente al uso de, por ejemplo, un marcador fluorescente como, por ejemplo, una proteína fluorescente verde (GFP) y sus derivados. Por ejemplo, Liu y col. Biochem. Biophys. Res. Comm. 260 (1999)712-717) observaron efectos tóxicos cuando usaron un marcador tipo GFP. Dichos efectos tóxicos pueden evitarse, o al menos minimizarse, si se usa una molécula marcadora secretada simplemente cambiando el medio de cultivo con regularidad y evitando con ello que se genere una concentración tóxica de la molécula marcadora correspondiente.

Asimismo, un método preferido para la diferenciación de células es hacerlas crecer como cuerpos embrioides (EB), que muestran un elevado nivel de autofluorescencia incluso en el caso de células lisadas. Este fondo puede hacer que el uso de genes marcadores fluorescentes para el seguimiento de la diferenciación celular sea bastante ineficaz. Otras moléculas marcadoras usadas de forma habitual como, por ejemplo, beta-galactosidasa o luciferasa requieren que las células sean evaluadas en una determinada solución tampón para análisis, lo que significa que las células deben ser destruidas para determinar la actividad enzimática. El sistema según la presente invención evita esto al emplear una molécula marcadora secretada, de modo que es suficiente someter a análisis el medio de cultivo de las células que se están diferenciando o el fluido corporal de un animal que contiene dichas células para hacer el seguimiento de la actividad marcadora y, por lo tanto, de la diferenciación.

Esto significa, como se muestra en el ejemplo 3, que con el sistema marcador de la invención es posible, por una parte, cuantificar tipos celulares derivados de células madre como, por ejemplo, cardiomiocitos y, por otra parte, o de forma adicional, hacer el seguimiento del proceso de diferenciación de la célula madre individual. Por tanto, hacer el seguimiento de la diferenciación celular según la presente invención incluye hacer el seguimiento de la diferenciación celular cuantificando las células diferenciadas y/o seguir el proceso de diferenciación de una o más de las células indiferenciadas correspondientes, por ejemplo, células madre.

Para la transfección de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína marcadora puede emplearse cualquier método estándar conocido por el experto en la técnica. Puede usarse cualquier vector de expresión adecuado para este fin. Los sistemas vectoriales virales para producir células madre modificadas según esta invención pueden prepararse usando componentes virales comerciales. La introducción del constructo o constructos vectoriales en las células tiene lugar de forma conocida, p. ej., mediante transfección o transducción con ayuda de vectores virales. La transfección de plásmidos vectoriales en células puede lograrse, p. ej., mediante electroporación o lipofección, es decir, usando complejos de lípido/ADN. Es ilustrativa la formulación Lipo-fectamine 2000™, comercializada por Gibco/Life Technologies. Otro reactivo ilustrativo es el reactivo de transfección FuGENE(TM) 6, una mezcla de lípidos en forma no liposomal y otros compuestos en etanol al 80%, comercializada por Roche Diagnostics Corporation. Los vectores virales que comprenden genes efectores se describen generalmente en las publicaciones citadas en la sección anterior.

Las células a transfectar deben ser capaces de diferenciarse en, al menos, un tipo celular particular. Este será el caso para la célula precursora del tipo celular deseado. Las células precursoras incluyen, sin limitarse a ello, por ejemplo, la línea celular precursora neuronal humana NTERA-2 cl.D1. (Leypoldt y col., J. Neurochem. 76 (2001), 806-814), la línea celular precursora retinal humana KGLDMSM (Ezeonu y col., DNA Cell Biol. 19 (2000), 527-537), una línea celular leucémica humana, PER-117, con marcadores de un fenotipo precursor de células T (Kees, Blood 72 (1988), 1524-1529) o HL60, una línea celular de leucemia promielocítica que se diferencia en neutrófilos maduros (Fontana, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 3664-3668).

Puesto que estas líneas celulares precursoras tienen solamente un intervalo limitado de capacidad de desarrollo, es preferible usar células multipotentes o pluripotentes. Esto es así cuando dichas células se obtienen a partir de células madre o células germinales primordiales preferidas en las realizaciones de la presente invención.

Cualquier parte de la descripción que se refiera a células madre embrionarias humanas que puedan prepararse exclusivamente mediante un método que implique, de forma necesaria, la destrucción de embriones humanos no forma parte de la presente invención. Las referencias a las mismas se hacen únicamente con fines descriptivos.

La invención puede llevarse a la práctica usando células madre de cualquier especie de vertebrados. Se incluyen células madre de humanos, así como de primates no humanos, animales domésticos, ganado, y otros mamíferos no humanos. Son fuentes preferidas de células madre los roedores, especialmente ratones y ratas. Entre las células madre adecuadas para usar en esta invención se encuentran las células madre pluripotentes de primates obtenidas a partir de tejido formado tras la gestación como, por ejemplo, un blastocito, o tejido fetal o embrionario extraído en cualquier etapa de la gestación. Son ejemplos no limitativos líneas establecidas de células madre embrionarias. La invención también es aplicable a células madre adultas, por ejemplo, células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs); véase, p. ej., Reyes y Verfaillie, Ann. N Y Acad. Sci. 938 (2001), 231-235 y Weissman y Anderson, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17 (2001), 387-403. Se hace referencia también a la fuente bibliográfica de Anderson y col., Nat. Med. 7 (2001), 393-395, y Prockop, Science 276 (1997), 71-74, en donde se describe la extracción y cultivo de células madre adultas.

Los medios para aislar y propagar las células madre pueden tener diversas fórmulas diferentes, siempre y cuando las células obtenidas tengan las características deseadas y pueden propagarse adicionalmente. Fuentes adecuadas incluyen medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), Gibco, #12440-053; medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco #11965-092; medio Knockout de Eagle modificado por Dulbecco (KO DM EM), Gibco #10829-018; 200 mM L-glutamina, Gibco # 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050; [beta]-mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor de crecimiento de fibroblasto básico recombinante humano (bFGF), Gibco # 13256-029. Se conocen medios para ES que contienen sueros ilustrativos y condiciones para el cultivo de células madre y pueden optimizarse adecuadamente según el tipo celular. En las referencias citadas en la presente memoria se proporcionan medios y técnicas de cultivo para los tipos celulares específicos mencionados en la sección anterior.

Debido a su amplio intervalo de capacidad de desarrollo, dichas células madre son células madre embrionarias (ES) en una realización especialmente preferida de esta invención.

Como se ha mencionado anteriormente, se encuentran disponibles para el experto en la técnica diversas fuentes de células ES de entre las cuales se prefieren células madre humanas para la mayoría de las realizaciones de la presente invención. Las células madre embrionarias humanas, y su uso para preparar células y tipos de tejido diferente se describen también en Repord. Biomed. Online 4 (2002), 58-63. Las células madre embrionarias pueden aislarse a partir de blastocitos de miembros de las especies de primates (Thomson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

92 (1995), 7844). Las células germinales embrionarias (EG) humanas pueden prepararse a partir de células germinales primordiales presentes en el material fetal humano extraídas aproximadamente 8-11 semanas después del último período menstrual. Métodos de preparación adecuados se describen en Shambloott y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), 13726. En la patente estadounidense US-A-6.245.566 se describen métodos para preparar células que se asemejan a células madre embrionarias o células germinales embrionarias en términos de morfología y pluripotencia obtenidas a partir de células germinales primordiales aisladas a partir de tejido embrionario humano como, por ejemplo, a partir de los precursores de las gónadas de embrión humano.

Recientemente, se ha manifestado que el diente decíduo humano exfoliado, un tejido relativamente muy accesible, contiene células madre multipotentes identificadas como una población de células clonogénicas muy proliferativas capaces de diferenciarse en una variedad de tipos celulares, incluidas células neurales, adipocitos, y odontoblastos; véase, Miura y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003), 5807-5812. Tras el trasplante in vivo, se descubrió que dichas células son capaces de inducir formación de hueso, generar dentina, y sobrevivir en cerebro de ratón junto con la expresión de marcadores neurales. Además, el potencial multilíneaje de células madre homocigóticas obtenidas a partir de oocitos en metafase II ha sido descrito por Lin y col. en Stem Cells 21 (2003), 152-161. En Groundes y col. J. Histochem. Cytochem. 50 (2002), 589-610 se revisan diversas fuentes de células precursoras en músculos postnatales y los factores que pueden mejorar la participación de la célula madre en la formación de nuevos músculos esqueléticos y cardíacos in vivo. En la solicitud de patente estadounidense US2003/0032185 se describe la purificación de célula/s madre hematopoyética/s (HSC) raras hasta conseguir homogeneidad que se acogen en la médula ósea. Se describe que estas células de médula ósea adultas tienen una enorme capacidad de diferenciación puesto que pueden diferenciarse asimismo en células epiteliales del hígado, pulmón, tracto gastrointestinal y piel. Este hallazgo puede contribuir al tratamiento clínico de enfermedades genéticas o reparación de tejido. Además, pueden emplearse técnicas como, por ejemplo, transferencia nuclear para reconstrucción embrionaria en donde dichos núcleos donantes diploides se trasplantan en oocitos en metafase madura II (mII) desnucleados. Esta tecnología junto con otros procedimientos que ayudan al establecimiento de líneas de células madre embrionarias (ES) con características específicas adaptadas genéticamente e idénticas a las del receptor ha sido reseñada por Colman y Kind, Trends Biotechnol. 18 (2000), 192-196.

El campo de la tecnología de las células madre está siendo estudiado por Kiessling y Anderson, Harvard Medical School, en Human Embryonic Stem Cells: An Introduction to the Science and Therapeutic Potential; (2003) Jones and Bartlett Publishers; ISBN: 076372341X.

Para evitar el uso de, por ejemplo, embriones humanos como donantes de células madre, puede ser posible emplear animales no humanos transgénicos, especialmente mamíferos, como fuente de células madre embrionarias. Por ejemplo, en la patente estadounidense US-A-5.523.226 se describen composiciones y métodos para obtener cerdos transgénicos para usar como donantes para xenoinjertos. Asimismo, WO97/12035 describe métodos para producir animales transgénicos para xenotransplantes. Además, en WO01/88096 se describe tejido animal inmunológicamente compatible, adecuado para xenotransplante en pacientes humanos. Métodos para obtener células germinales embrionarias de origen porcino se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense US-A-6.545.199. También pueden emplearse células inmunológicamente compatibles con humanos para los fines de la presente invención.

Las células madre pueden propagarse continuamente en cultivo usando una combinación de condiciones de cultivo que promuevan la proliferación sin promover la diferenciación. Tradicionalmente, las células madre se cultivan sobre una capa celular de soporte, típicamente células de tipo fibroblasto, a menudo obtenidas a partir de tejido embrionario o fetal. Las líneas celulares se cultivaron en placa hasta confluencia, usualmente irradiadas para evitar la proliferación, y a continuación se usaron para sustentar cuando se cultivaron en un medio acondicionado por determinadas células (p. ej., Koopman y Cotton, Exp. Cell 154 (1984), 233-242; Smith y Hooper, Devel. Biol. 121 (1987), 1-91), o mediante la adición exógena de factor inhibidor de leucemia (LIF). Dichas células pueden cultivarse de forma relativamente indefinida usando las condiciones de cultivo adecuadas sin diferenciación.

En ausencia de células soporte, factor inhibidor de la leucemia exógeno (LIF), o medio acondicionado, las células ES o EG se diferencian de forma espontánea en una amplia variedad de tipos celulares, incluidas las células presentes en cada una de las capas germinales endodérmica, mesodérmica, y ectodérmica. Con las combinaciones adecuadas de factores de crecimiento y diferenciación, sin embargo, puede controlarse la diferenciación celular. Por ejemplo, las células ES y EG de ratón pueden generar células del linaje hematopoyético in vitro (Keller y col., Mol. Cell Biol. 13 (1993), 473-486; Palacios y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7530-7534; Rich, Blood 86 (1995), 463-472). De forma adicional, las células ES de ratón se han usado para generar cultivos in vitro de neuronas (Bain y col., Developmental Biology 168 (1995), 342-357; Fraichard y col., J. Cell Science 108 (1995), 3161-3188) cardiomiocitos (células musculares del corazón) (Klug y col., Am. J. Physiol. 269 (1995), H1913-H1921),

células musculares esqueléticas (Rohwedel y col., Dev. Biol. 164 (1994), 87-101), células vasculares (Wang y col., Development 114 (1992), 303-316). La patente estadounidense US-A-5.773.255 se refiere a líneas celulares beta pancreáticas que secretan insulina en respuesta a la glucosa, la patente estadounidense US-A-5.789.246 se refiere a células precursoras de hepatocitos. La diferenciación hepática de células madre embrionarias murinas se describe también en Jones y col., Exp. Cell Res. 272 (2002), 15-22.

Otros progenitores de interés incluyen, sin limitarse a ello, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales del pigmento de la retina, fibroblastos, células de la piel como, por ejemplo, queratinocitos, células dendríticas, células foliculares del cabello, células epiteliales del conducto renal, células musculares lisas y esqueléticas, progenitores testiculares, y células endoteliales vasculares.

En determinadas realizaciones de la presente invención, la diferenciación se promueve retirando uno o más componentes del medio que promueve o promueven el crecimiento de células indiferenciadas o que actúa o actúan como inhibidores de la diferenciación. Entre los ejemplos de dichos componentes se incluyen determinados factores de crecimiento, mitógenos, factor inhibidor de leucocitos (LIF), y factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF). La diferenciación puede favorecerse también añadiendo un componente del medio que favorezca la diferenciación hacia el linaje celular deseado, o que inhiba el crecimiento de las células con características no deseadas.

En una realización preferida de la presente invención, dicho gen informador en la molécula de ácido nucleico recombinante descrito anteriormente se une operablemente a, al menos, una secuencia reguladora específica del tipo celular. Esta realización tiene la ventaja de proporcionar no solo un sistema de seguimiento para la diferenciación en sí, sino que permite además observar la diferenciación en un tipo celular determinado. La secuencia reguladora transportará la expresión de la molécula informador solamente a aquellas células que adquieran el tipo celular deseado mediante diferenciación. Habitualmente, dicha secuencia reguladora comprende dichos elementos promotores y/o potenciadores. Además, o alternativamente, puede usarse un segundo gen informador que está bajo control de dicha secuencia reguladora específica para el tipo celular. El segundo gen informador puede ser el mismo que el usado para la expresión dependiente de la diferenciación o diferente, incluyendo genes informadores convencionales como, por ejemplo, el de proteína fluorescente verde (GFP). Además, el segundo gen informador puede estar presente en la molécula de ácido nucleico recombinante o en un constructo vectorial diferente, requiriendo la última opción la cotransfección de ambas moléculas en las células.

En otra realización, las células diferenciadas que contienen la molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención y de forma opcional ADN exógeno como, por ejemplo, los constructos vectoriales descritos anteriormente en la presente memoria, se enriquecen y separan de las células no diferenciadas y/o de las células de tipos celulares no deseados. Por lo tanto, según esta invención, las poblaciones de células diferenciadas se vacían de células relativamente indiferenciadas y/o de células de tipos celulares no deseados usando un sistema de selección que es letal para las células y tipos celulares no deseados. Esto puede lograrse, por ejemplo, expresando un gen marcador seleccionable bajo el control de una secuencia reguladora que hace que el gen se exprese, preferentemente, en el tipo celular deseado y/o en una determinada etapa del desarrollo, lo que hace que las células de un tipo celular específico se vuelvan más resistentes a un efecto letal de un agente externo. Para lograr esto, las células se alteran genéticamente con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende el gen marcador seleccionable antes del proceso usado para diferenciar las células en el linaje deseado. El sistema de selección puede estar presente en la molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención o en un constructo vectorial diferente que es usado para la cotransfección.

Los tipos celulares a los cuales va dirigida la diferenciación incluyen fibroblastos de conexión, células estromales, células endoteliales, células gliales, células neurales, células neuronales, células hematopoyéticas, células musculares lisas, células musculares esqueléticas, células epiteliales, y células cardíacas. Para hacer el seguimiento de la diferenciación en estos tipos celulares en particular, las secuencias reguladoras tienen que estar unidas operativamente a la secuencia génica codificadora que confiere una expresión del codificador que es específico para dichos tipos celulares.

En una realización preferida del método según la presente invención, dicho promotor o potenciador se selecciona del grupo que consiste en promotor o potenciador α MHC, MLC2V, VE-cadherina, Tie-2, Flk-1, Flt-1, GFAP, tubulina alfa-1 y colágeno 2. Mientras que el promotor/potenciador de cadena de colágeno pro-alfa (II) (Zhou y col., J. Cell Sci. 108 (1995), 3677-3684) es específico para condrocitos, la expresión en las células endoteliales puede ser activada por el promotor VE-cad (Gory y col., Blood 93 (1999), 184-192), el promotor Flt-1 (quinn y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 276 (2000), 1089-1099), el Tie-2 (Schlaeger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3058-3063) y el promotor/potenciador Flk-1 (Kappel y col., Blood 93 (1999), 4284-4292), respectivamente. El promotor tubulina alfa-1 (Gloster y col., J. Neurosci. 14 (1994), 7319-7330) y el promotor de proteína fibrilar acídica de la glia (GFAP)

- (Besnard y col., J. Biol. Chem. 266 (1991), 18877-18883) son específicos para las células neurales. El promotor mínimo de la cadena pesada de musculo liso (SMHC) es específico para músculos lisos (Kallmeier y col., J. Biol. Chem 270 (1995), 30949-30957). Un vector HSV-1 que contiene el promotor de tirosina hidroxilasa de rata para usar tanto en expresión a largo plazo como en expresión específica del tipo celular en la parte central del cerebro se describe en Song y col., in J. Neurochem. 68 (1997), 792-803. Los promotores específicos cardíacos como, por ejemplo, el promotor de cadena pesada de alfa-miosina (α MHC) y el promotor de cadena 2v ligera de miosina (MLC2v), siendo el último específico para músculos del corazón ventriculares, se describen más detalladamente más adelante en la presente memoria.
- 5
- 10 Son ejemplos adicionales de promotores específicos de tejido los que son activos en células hematopoyéticas, células de cartilago o células epidérmicas, así como células p que secretan insulina.
- “Específico del tejido” se incluye en el término “específico de la célula”. Las secuencias reguladoras de los tipos celulares descritos anteriormente y otros promotores específicos del tipo celular pueden encontrarse en las fuentes bibliográficas; véase, p. ej., “medline” y NCBI.
- 15
- Las enfermedades cardiovasculares se encuentran todavía entre las causas más frecuentes de muerte en los países industrializados de occidente. Solamente mediante investigación básica intensiva en este campo pueden descubrirse las causas patofisiológicas, y pueden concebirse nuevos planteamientos terapéuticos, y pueden describirse cambios toxicológicos. Para estudiar la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares y para ensayar nuevas sustancias farmacológicas y toxicológicas se necesitan modelos que, por una parte, pueden transferirse a los humanos y, por otra, pueden remplazar los modelos animales que resultan tediosos y caros. En el año 1991, solamente en los estados de la antigua Alemania Occidental se habían empleado más de 2 millones de animales.
- 20
- 25 Un punto de partida de la investigación farmacológica y toxicológica que ha adquirido una importancia cada vez mayor en tiempos recientes es la diferenciación cardíaca. Para el desarrollo de las células del corazón que tiene lugar de forma típica, puede concluirse que se producen cambios patológicos y toxicológicos de los cardiomiocitos. Por lo tanto, por ejemplo, se sabe que el estado del receptor y las cascadas de la señal intracelular se ven alteradas en la hipertrofia cardíaca (Yamazaki y col., J. Mol. Cell Cardiol. 27 (1995), 133-140) e insuficiencia cardíaca (Johnson y col., Biochem. Pharmacol. 45 (1993), 2365-2372). Estos cardiomiocitos alterados patológicamente son de nuevo parcialmente similares a las células del corazón de las etapas iniciales de la diferenciación. Por lo tanto, además de evaluaciones toxicológicas, se necesitan análisis para la identificación y aislamiento de sustancias capaces de promover remodelado cardíaco, lo que puede usarse para intervenciones terapéuticas en el tratamiento de pacientes con disfunción cardíaca caracterizada por, por ejemplo, hipertrofia patológica y fibrosis.
- 30
- 35 Sin embargo, los exámenes necesarios para elucidar las propiedades de las células del corazón en etapas iniciales de la diferenciación son técnicamente difíciles de llevar a cabo con animales vivos y, si pueden llevarse a cabo, es únicamente en estudios muy complicados: el día 12-13, como fecha más temprana posible, es posible preparar cardiomiocitos a partir de embrión murino, pero dichas células ya no corresponden a una etapa temprana de diferenciación cardíaca. Un análisis detallado de la expresión del receptor durante diversas etapas de la diferenciación requiere un gasto muy elevado de material animal y es técnicamente difícil de llevar a cabo según se ha expuesto anteriormente en la presente memoria. De forma similar, con un modelo animal no es posible llevar a cabo la observación del desarrollo de una célula del corazón relativamente indiferenciada durante varios días o semanas. Para someter a análisis el uso de agentes terapéuticos novedosos, p. ej., sustancias inotrópicas o antiarrítmicas o sustancias tóxicas, p. ej., metales pesados o retinoides, debe llevarse a cabo un seguimiento invasivo de los animales, p. ej., cerdos.
- 40
- 45 Ahora, ha sido el objeto de la presente invención proporcionar un análisis celular que permita una caracterización sencilla de los efectos de los compuestos en la cardiomiogénesis y permita realizar exámenes funcionales en lugar de estar basado en genes informadores como, por ejemplo, Lac-Z (Niwa y col., Gene 108 (1991), 193-199; Wobus y col., J. Mol. Cell Cardiol. 29 (1997), 1525-1539; Metzger y col., Circ. Res. 78 (1996), 547-552), del mismo modo que en los métodos anteriores, de cuyos genes puede detectarse la expresión solo tras la fijación de la célula y mediante un sustrato específico.
- 50
- 55 Sorprendentemente, se ha descubierto que las células ES pueden ser transfectadas de modo estable con un constructo de ADN en el que el gen que codifica la proteína marcadora secretada se acopla con un promotor específico de cardiomiocito y dependiente de la célula y del desarrollo; véanse los ejemplos y la secuencia vectorial representada en SEQ ID NO: 3. Este constructo se integra en el ADN nativo y tras la activación específica de las señales intracelulares el promotor se activa y la proteína marcadora se expresa y secreta en el medio. Por lo tanto, las células ES que activan un factor de transcripción específico de la célula en un momento específico de la
- 60

diferenciación podrían reconocerse determinando el nivel de proteína marcadora o su actividad en el medio de cultivo celular.

5 El propósito del método de la presente invención según se ilustra en los ejemplos lleva implícito que la molécula marcadora empleada debería ser secretada realmente en el medio de cultivo celular, o en caso de un animal no humano transgénico, en el fluido corporal. Si, por el contrario, la molécula marcadora secretada fuera recapturada del medio y del fluido corporal, según el caso, sería prácticamente imposible cuantificar las células diferenciadas, puesto que la cantidad medida de actividad o proteína activa en el sobrenadante de cultivo celular o fluido corporal podría no mantener una buena correspondencia o no corresponderse en absoluto con el número real de células diferenciadas y/o con el estado de la diferenciación. Por lo tanto, las moléculas marcadoras como, por ejemplo, la alfa-galactosidasa humana que, cuando se glicosila correctamente, puede ser tomada por las células mediante receptores de manosa-6-fosfato no serían, al menos en su forma nativa, moléculas marcadoras adecuadas para los fines de la presente invención. No obstante, puede hacerse que esta enzima sea adecuada para los fines de la presente invención, p. ej., aboliendo su capacidad de ser glicosilada, por ejemplo, mediante las mutaciones correspondientes en el ADN subyacente que codifica la enzima.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, dichas células que se diferencian son cardiomiocitos. Para esta realización, dicha secuencia reguladora con especificidad para el tipo celular tiene preferiblemente especificidad atrial y/o ventricular. Las secuencias reguladoras correspondientes, es decir, los promotores con especificidad cardíaca se han descrito en la técnica anterior; véase también las fuentes citadas anteriormente en la presente memoria. Por ejemplo, Nkx-2.5 específico para cardiomiocitos en estadios muy iniciales y células precursoras mesodérmicas, respectivamente, (Lints y col., *Development* 119(1993), 419-431); α -actina humana específica para tejido del corazón, (Sartorelli y col., *Genes Dev.* 4 (1990), 1811-1822), y MLC-2V específica para células musculares del corazón ventriculares (O'Brien y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (1993), 5157-5161; Lee y col., *Mol. Cell Biol.* 14 (1994), 1220-1229; Franz y col., *Circ.* 73 (1993), 629-638 y WO96/16163). El promotor de cadena pesada de alfa-miosina con especificidad cardíaca se describe en Palermo y col., *Cell Mol.* 266 (1991), 9180-91855. La expresión de la cadena pesada de miosina con especificidad atrial AMHCL y el establecimiento de la polaridad anteroposterior en el desarrollo del corazón de pollo se describe en Yutzey y col., *Development* 120 (1994), 871-883.

Puesto que se facilita la detección usando una molécula marcadora para la cual existe un análisis robusto, sensible y específico, una realización especialmente preferida es el método según la presente invención en donde dicho producto génico marcador es fosfatasa alcalina secretada (SEAP), alfa-amilasa o invertasa.

35 La SEAP es resistente al calor y no es inhibida por la L-homoarginina. Otras ventajas de esta molécula marcadora son su baja toxicidad y el hecho de que los niveles de proteína que se secretan corresponden directamente a la cantidad de ARNm intracelular. Por lo tanto, el análisis de marcador SEAP proporciona una medición directa para la expresión específica para el tipo celular y, por lo tanto, para la diferenciación. También es muy sensible: es posible detectar 10^{-13} g de proteína SEAP (Yang y col., *Biotechniques* 23 (1997), 1110-1114). Esto hace posible detectar la diferenciación en tipos celulares que son raros.

El uso de alfa-amilasa como molécula marcadora se describe en, por ejemplo, WO98/49320. Esta molécula marcadora es especialmente atractiva porque la enzima es muy estable en condiciones muy diversas. La medida de la actividad de alfa-amilasa es sencilla, cuantitativa, sensible, segura y económica. También ha mostrado compatibilidad con un sistema marcador SEAP (Schlatter y col., *Gene* 282 (2002), 19-31). El uso de invertasa como una proteína marcadora se describe, por ejemplo, en Mace y col., *Virology* 188 (1992), 869-874.

Los constructos de gen codificador que comprenden, entre otros, fosfatasa alcalina secretada como molécula codificadora y que, por lo tanto, pueden usarse como fuente para preparar constructos vectoriales según la presente invención se describen, por ejemplo, en WO00/34435 y Wang y col., *Gene* 279 (2001), 99-108, de los cuales el último describe SEAP murínica. La detección de nivel de SEAP puede realizarse según se describe en los ejemplos y en la técnica anterior; véase, p. ej., Bronstein y col., *Biotechniques* 17(1994), 172-177; Yang y col. (1997) y Wang y col. (2001), mencionadas anteriormente en la presente memoria. El uso de fosfatasa alcalina secretada por humanos en un modelo de gen codificador de ratón in vivo para hacer el seguimiento del crecimiento de un tumor ovárico y la respuesta al tratamiento terapéutico se ha descrito en Nilsson y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49 (2002), 93-100. Este modelo puede adaptarse a las realizaciones de la presente invención. Genes codificadores de fosfatasa alcalina secretada obtenidos mediante procesos de ingeniería genética capaces de ser expresados en un mamífero durante largos períodos de tiempo y detección de actividad de fosfatasa alcalina midiendo los niveles de proteína o actividad de fosfatasa alcalina de una muestra de suero o de tejido de un mamífero que contiene la célula con el gen transgénico, o midiendo los medios a partir de una célula cultivada que contiene el gen transgénico se

describen también en WO02/095068. La cantidad de actividad o proteína codificadora, en particular de actividad de SEAP, puede detectarse en cualquier fluido biológico como, por ejemplo, leche materna, plasma seminal, serum y orina.

5 Puesto que no todas las moléculas que pueden usarse como mensajeras se secretan de forma natural, la molécula de ácido nucleico introducida en las células puede ser manipulada mediante métodos de ingeniería genética para codificar una proteína que es excretada. Es especialmente preferido el método descrito anteriormente en la presente memoria, en donde dicho producto génico codificador comprende una secuencia líder secretora. Son ejemplos de secuencias líder secretoras, sin limitarse a ello, la secuencia líder tripartita (Chu y col., *Biotechniques* 5 (1995), 890-896), la señal de secreción de inmunoglobulina (Schlatter y col., *Gene* 282 (2002), 19-31), la secuencia de señal de SUC2, así como la secuencia de la señal de cadena alfa del receptor interleuquina-2 humana (Kamiya y col., *Tohoku J. Exp. Med* 180 (1996), 297-308.

15 Para seleccionar las células que contienen la molécula de ácido nucleico recombinante según la presente invención y, opcionalmente, otros constructos vectoriales como, por ejemplo, los que se han descrito anteriormente en la presente memoria, dichas moléculas de ácido nucleico recombinante y constructos vectoriales, respectivamente, comprenden preferiblemente además un marcador que puede seleccionarse expresado mediante células multipotentes o pluripotentes. Los marcadores que pueden seleccionarse son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, genes resistentes a los antibióticos de tipo nucleósido y aminoglicósido que confieren resistencia a, p. ej., puromicina, neomicina o higromicina. Otros ejemplos de genes resistentes son dehidrofolato-reductasa, que confiere resistencia contra aminopterina y metotrexata, así como genes con resistencia a múltiples medicamentos, que confieren resistencia contra un número de antibióticos, p. ej., contra vinblastina, doxorubicina y actinomicina D; véase, p. ej., Blau y col., *Blood* 89 (1997), 146-154, que describe el uso del gen de resistencia a múltiples medicamentos (MDR1) gen 1 como un marcador seleccionable dominante.

25 En una realización especialmente preferida de la presente invención, dicho marcador seleccionable confiere resistencia a puromicina. La puromicina es especialmente adecuada para la rápida eliminación de células no cardíacas en cultivo adherente de EB transgénicos. Además, la selección de medicamentos de células cardíacas puede llevarse a cabo por completo en el cultivo de suspensión de EB transgénicos. Por lo tanto, podría mostrarse también que los cardiomiocitos derivados de células ES purificados sobreviven durante un período de tiempo mucho mayor en cultivo que los homólogos sin tratar. Además, la eliminación de células ES no diferenciadas durante el proceso de selección de medicamentos ha mostrado tener por sí misma un efecto positivo claro en la viabilidad y longevidad de dichas células derivadas de células ES como cardiomiocitos. Además, podría mostrarse de forma sorprendente que la liberación de células no diferenciadas próximas induce la proliferación de cardiomiocitos. Por lo tanto, la selección de medicamentos posee tanto un efecto purificante como un efecto de multiplicación; véase, p. ej., WO02/051987. Por lo tanto, la selección no solo proporciona los medios para eliminar células que no pueden someterse a un seguimiento debido a que no llevan el gen informador, sino que también permite la eliminación de células que no se diferencian en el tipo celular deseado, siempre y cuando el gen informador y el gen marcador que puede seleccionarse sean transportados por la misma secuencia reguladora específica del tipo celular.

40 El método según la presente invención, en el que dichas células forman agregados celulares o agregados tisulares derivados de diferentes tipos celulares ME es una realización preferida, y son especialmente preferidas aquellas células que forman cuerpos embrioides (EB). Según se ha mencionado anteriormente, los cuerpos embrioides representan un grupo complejo de células que se diferencian en tejido diferente. En una realización, las células con un cuerpo embrioide son esencialmente sincronizadas para su diferenciación. Por tanto, a intervalos conocidos, la mayor parte de las células sincronizadas se diferencian en las tres capas geminales embrionarias y continúan diferenciándose en múltiples tipos de tejido como, por ejemplo, cartílago, hueso, músculo liso y estriado, y tejido neural, incluyendo ganglios embrionarios; véase también Snodgrass y col., "Embryonic Stem Cells: Research and Clinical Potentials" en Smith and Sacher, eds. *Peripheral Blood Stem Cells American Association of Blood Banks*, Bethesda MD (1993). Por lo tanto, las células en cuerpos embrioides proporcionan un modelo mucho más próximo a la complejidad de los organismos enteros que los análisis con células sencillas tradicionales o levaduras, y tampoco debe hacerse frente al coste y dificultades asociadas con el uso de ratones y ratas y mamíferos de mayor tamaño. Además, la reciente disponibilidad de cuerpos embrioides humanos mejora la capacidad predictiva de la presente invención proporcionando un vehículo aún más próximo para modelizar la toxicidad y para identificar medicamentos útiles para el tratamiento de los desórdenes cardíacos en sistemas de organismos humanos y en humanos.

55 El cuerpo embrioide de la presente invención comprende una población celular, siendo la mayoría de las mismas células pluripotentes capaces de desarrollarse formando linajes celulares diferentes cuando se cultivan bajo las condiciones adecuadas. Es preferible que el cuerpo embrioide comprenda, al menos, 51% de células pluripotentes derivadas de células ES totipotentes. Más preferiblemente, el cuerpo embrioide comprende, al menos, 71% de

células pluripotentes derivadas de células ES totipotentes. Más preferiblemente aún, el cuerpo embriode comprende, al menos, 95% de células pluripotentes derivadas de células ES totipotentes.

5 En su forma más sencilla, el método de creación de un perfil molecular según la presente invención incluye poner en contacto cuerpos embrioides con una composición química de interés y, a continuación, determinar las alteraciones en la actividad codificadora o cantidad de proteína codificadora, o ambas, en el cuerpo embriode expuesto a la composición química (el "cuerpo embriode de análisis") en comparación con un cuerpo embriode que no ha sido expuesto al agente (un "cuerpo embriode de control").

10 Por lo tanto, el método de la presente invención puede llevarse a cabo de modo que permita el auto-ensamblaje de células en los agregados o estructuras tisulares. El término "cuerpos embrioides" (EB) es un término de la técnica sinónimo de "cuerpos agregados". Los términos se refieren a agregados de células diferenciadas e indiferenciadas que aparecen cuando se produce un crecimiento excesivo de células ES en cultivos monocapa, o se mantienen en cultivos en suspensión. Los cuerpos embrioides son una mezcla de diferentes tipos celulares, de forma típica de
15 varias capas germinales, que pueden distinguirse mediante criterios morfológicos. WO02/051987 describe un protocolo para obtener cuerpos embrioides. La fabricación tiene lugar, preferiblemente, con el método de la "gota colgante" o mediante cultivo de metilcelulosa (Wobus y col., Differentiation 48 (1991), 172-182).

20 De forma alternativa, pueden usarse matraces de centrifugación (cultivos en agitación) como método de cultivo. Por lo tanto, se introducen células ES no diferenciadas en cultivos de agitación y se mezclan de forma permanente según un procedimiento establecido. Por lo tanto, se introducen 10 millones de células ES en 150 ml de medio con 20% de suero fetal de ternero (FCS) y se agitan constantemente con una velocidad de 20 rpm, cambiándose de forma regular la dirección del movimiento de agitación. 24 horas después de la introducción de las células ES, se añaden 100 ml adicionales de medio con suero y, posteriormente, se cambian a diario 100-150 ml del medio
25 (Wartenberg y col., FASEB J. 15 (2001), 995-1005). Bajo estas condiciones de cultivo pueden obtenerse grandes cantidades de células derivadas de células ES, es decir, cardiomiocitos, células endoteliales, neuronas, etc., dependiendo de la composición del medio. Las células se seleccionan mediante el gen de resistencia, en el medio todavía en agitación o tras hacer el cultivo en placas.

30 En una realización especialmente preferida de la presente invención, se preparan cuerpos embrioides según un sistema de "cultivo en masa" desarrollado recientemente, empleado en los ejemplos anexos y descrito detalladamente en la solicitud internacional WO2005/005621.

35 Los cuerpos embrioides usados para someter a análisis la composición química pueden ser de cualquier especie de vertebrado. La selección de la especie específica a partir de la cual se deriva el cuerpo embriode reflejará de forma típica un equilibrio de diversos factores. En primer lugar, dependiendo de la finalidad del estudio, puede tenerse especial interés en una o más especies. Por ejemplo, los cuerpos embrioides humanos serán de especial interés para usar en composiciones que vayan a ensayarse como sustancias potencialmente terapéuticas, pero también para análisis toxicológicos para sustancias que incluyen sustancias químicas industriales, mientras que los cuerpos
40 embrioides equinos, felinos, bovinos, porcinos, caprinos, caninos u ovinos pueden tener un mayor interés para un uso potencialmente terapéutico en veterinaria. También son preferidos cuerpos embrioides de otras especies de uso habitual en análisis preclínicos como, por ejemplo, cobayas, ratones, ratas, conejos, cerdos y perros. De forma típica, se usarán cuerpos embrioides de estas especies para un rastreo exhaustivo de "primer paso", o cuando no se necesite información detallada sobre toxicidad en humanos, o cuando se haya relacionado un resultado en la especie murina u otra especie de laboratorio con una toxicidad conocida u otro efecto en humanos. Además, con respecto a las aplicaciones terapéuticas en humanos, las agencias reguladoras generalmente requieren datos de estudios en animales antes de comenzar a realizar análisis en humanos; generalmente, se deseará usar cuerpos embrioides de especies que se usarán en los estudios animales preclínicos. Los resultados de análisis de toxicidad en los cuerpos embrioides pueden entonces guiar al investigador en el grado y tipo de toxicidad anticipada durante
50 los análisis en animales. En la técnica se sabe que determinadas especies animales son mejores modelos de toxicidad humana de diferentes tipos que otras, y las especies difieren también en su capacidad para metabolizar los medicamentos; véase, p. ej., Williams, Environ. Health. Perspect. 22 (1978), 133-138; Duncan, Adv. Sci. 23 (1967), 537-541. Por lo tanto, la especie particular preferida para usar en un estudio de toxicidad preclínico específico puede variar según el uso previsto de la sustancia candidata a medicamento. Por ejemplo, una especie que proporciona un método adecuado para un medicamento con un efecto previsto sobre el sistema reproductivo puede no ser un modelo adecuado para un medicamento con un efecto previsto sobre el sistema nervioso. En la técnica se conocen criterios para seleccionar especies apropiadas para análisis preclínicos.

60 Una vez que se ha iniciado un cultivo de un cuerpo embrionario, éste puede ponerse en contacto con una composición química. De forma conveniente, la composición química es una solución acuosa, preferiblemente en un

disolvente usado de forma convencional en un cultivo celular, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), y se introduce en el medio de cultivo; véanse también los ejemplos. La introducción puede realizarse por cualquier medio que resulte práctico para ello, pero generalmente será con una pipeta, una micropipeta o una jeringa. En algunas aplicaciones como, por ejemplo, selección de alto rendimiento, las composiciones químicas se introducirán por medios automáticos como, por ejemplo, sistemas de pipeteado automáticos, que pueden estar situados en brazos robotizados.

Las composiciones químicas pueden introducirse también en el medio de cultivo como formas en polvo o sólidas, con o sin excipientes farmacéuticos, aglutinantes, y otros materiales usados habitualmente en composiciones farmacéuticas, o con otros vehículos que puedan emplearse en el uso previsto. Por ejemplo, las composiciones químicas previstas para usar como sustancias químicas de uso en agricultura como agentes petroquímicos pueden introducirse en el medio por sí mismas para someter a análisis la toxicidad de las sustancias químicas o agentes, o introducirse en combinación con otros materiales con los que puedan usarse o que puedan encontrarse en el medio ambiente, para determinar si la combinación de las sustancias químicas o agentes tiene el mismo efecto sinérgico. De forma típica, los cultivos serán agitados al menos durante un breve intervalo de tiempo después de la introducción de una composición química para asegurar que la composición se disperse por todo el medio.

El momento en el cual se añade una composición química al cultivo puede ser determinado por el técnico y variará según el objetivo del estudio en particular. De forma conveniente, la composición química será añadida en cuanto el cuerpo embrioide se desarrolle a partir de células madre, permitiendo la determinación de la alteración en la expresión de la proteína o del gen en el desarrollo de todos los tejidos del cuerpo embrioide. Puede resultar de interés, sin embargo, centrarse en el estudio del efecto de la composición en un tipo de tejido específico. Como se ha mencionado previamente, el tejido individual como, por ejemplo, tejido muscular, nervioso y hepático, son conocidos para desarrollar en momentos específicos una vez que se ha formado el cuerpo embrioide. La adición de la composición química puede, por tanto, realizarse de modo que se produzca cuando el tejido de interés comienza a desarrollarse, o en un momento escogido tras el comienzo del desarrollo, para observar el efecto en la expresión del gen o proteína que se está alterando en el tejido de interés.

Se usarán cantidades diferentes de una composición química para poner en contacto con un cuerpo embrioide dependiendo de la cantidad de información conocida acerca de la toxicidad de dicha composición, la finalidad del estudio, el tiempo disponible y los medios que tenga disponibles el técnico. Una composición química puede administrarse a únicamente una concentración, en especial cuando otros estudios, trabajo o experiencia de campo previa con el compuesto hayan indicado que una concentración específica es la más habitual en el cuerpo. De forma más habitual, la composición química se añadirá a diferentes concentraciones en cultivos paralelos de cuerpos embrionarios, de modo que pueda evaluarse los efectos de las diferencias en la concentración de la expresión del gen o proteína y, por lo tanto, las diferencias en la toxicidad de la composición a diferentes concentraciones. De forma típica, por ejemplo, la composición química se añadirá a una concentración normal o media, y se ajustará mediante aumentos y disminuciones dobles o quintuples en la concentración, dependiendo del grado de precisión deseado.

Cuando la composición tiene una toxicidad desconocida, es conveniente llevar a cabo inicialmente un estudio preliminar para determinar los intervalos de concentración a los cuales se someterá a análisis la composición. En la técnica se conocen diversos procedimientos para determinar las dosis de concentración. Un procedimiento habitual, por ejemplo, es determinar la dosis a la cual el agente es directamente tóxico. El técnico reduce posteriormente la dosis a la mitad y lleva a cabo un estudio de dosificación, de forma típica administrando el agente de interés en diluciones a la quinta parte o a la mitad de la concentración a cultivos paralelos de células del tipo de interés. Para los contaminantes medioambientales, la composición se someterá también, de forma habitual, a la concentración a la cual se encuentra en el medio ambiente. Para sustancias químicas de uso en agricultura como, por ejemplo, pesticidas que dejan residuos en los productos alimenticios, el agente será sometido a análisis de forma habitual a la concentración a la que se encuentra el residuo, aunque será probablemente sometido a análisis también a otras concentraciones. Por lo tanto, la dilución de compuestos de análisis puede realizarse haciendo en tubos separados una serie de diluciones en DMSO de compuestos 50 ó 100 veces más concentrados. Uno o dos μ l de cada dilución se distribuyen en cada pocillo antes de distribuir la suspensión celular. Son especialmente preferidas series de solución madre y de diluciones según se describe para el ácido retinoico en el ejemplo 3.

Las consideraciones anteriores con respecto a poner en contacto las composiciones con los EB, tiempo de contacto, etc., también se aplican a los análisis de la presente invención realizados en, p. ej., células ES, tejido y animales no humanos, si es aplicable.

La presente invención también se refiere a constructos génicos informadores para hacer el seguimiento de la

diferenciación celular que comprenden la molécula de ácido nucleico recombinante definida previamente en la presente memoria, así como a células capaces de diferenciarse en, al menos, un tipo celular en particular que contienen dichos constructos génicos informadores, o que pueden obtenerse por los métodos descritos en la presente memoria. Asimismo, son objeto de la presente invención agregados celulares, tejido, órganos, implantes o trasplantes que comprenden dicho constructo génico informador que pueden obtenerse por los métodos descritos en la presente memoria o constituidos a partir de dichas células, agregados celulares, tejidos, órganos, implantes o trasplantes.

En otra realización, la presente invención se refiere a un animal no humano transgénico que puede generarse a partir de las células ES mencionadas y tipos celulares y agregados celulares derivados de células ES; véase lo descrito anteriormente en la presente memoria. Un método para la producción de un animal no humano transgénico que forma parte de la presente invención, por ejemplo, un ratón transgénico, comprende la introducción de un gen informador según se ha descrito anteriormente en una célula germinal, una célula embrionaria, célula madre o un huevo o una célula derivada de las mismas. El animal no humano puede usarse según un método de rastreo exhaustivo de la presente invención descrito en la presente memoria. La producción de embriones transgénicos y el rastreo exhaustivo de los mismos puede realizarse, p. ej., según se describe en A. L. Joyner Ed., *Gene Targeting, A Practical Approach* (1993), Oxford University Press. En la técnica se describe un método general para producir animales no humanos transgénicos; véase, por ejemplo, WO94/24274. Para obtener organismos no humanos transgénicos (lo que incluye animales no humanos homológamente seleccionados), se prefieren células madre embrionarias (células ES). Las células ES murinas como, por ejemplo, la línea AB-1 desarrollada en capas alimentadoras de células SNL76-77 sin actividad mitótica (McMahon y Bradley, *Cell* 62 (1990), 1073-1085) esencialmente según se ha descrito (Robertson, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press) (1987), 71-112) pueden usarse para la selección homóloga de genes. Otras líneas de células ES adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a ello, la línea E14 (Hooper y col., *Nature* 326 (1987), 292-295), la línea D3 (Doetschman y col., *J. Embryol. Exp. Morph.* 87 (1985), 27-45), la línea CCE (Robertson y col., *Nature* 323 (1986), 445-448), la línea AK-7 (Zhuang y col., *Cell* 77 (1994), 875-884) y otras; véase también lo mencionado anteriormente en la presente memoria. El éxito de generar una línea de ratón a partir de células ES portadoras de una mutación seleccionada específicamente depende de la pluripotencia de las células ES (es decir, de su capacidad, una vez inyectadas en un embrión huésped en desarrollo como, por ejemplo, un blastocito o mórula, para participar en la embriogénesis y contribuir a la formación de las células germinales del animal resultante). Se permite que los blastocitos que contienen las células ES inyectadas se desarrollen en los úteros de hembras no humanas en estado de pseudogestación y nacen como ratones quiméricos. Los ratones transgénicos resultantes se retrocruzan y se someten a un proceso de selección para determinar la presencia de gen o genes transgénicos correctamente desarrollados mediante PCR o análisis Southern blot de ADN obtenido mediante biopsia del rabo de descendientes para identificar ratones transgénicos para el locus o los loci. Por ejemplo, la expresión transitoria de un gen recombinasa introducido directamente en huevos fertilizados mediante inyección pronuclear proporciona un método rápido y eficaz para generar ratones mutantes con deleciones o translocaciones deseadas en genes seleccionados. En Sunaga y col., *Mol. Reprod. Dev.* 46 (1997), 109-113 se describe la eliminación eficaz de secuencias de ADN flanqueadas por sitios loxP en un locus específico para un gen mediante expresión transitoria de recombinasa Cre en huevos fertilizados. *Reprod. Dev.*

En la técnica se describen también métodos para producir moscas transgénicas como, por ejemplo, *Drosophila melanogaster*; véase, por ejemplo, US-A-4.670.388, Brand y Perrimon, *Development* 118 (1993), 401-415; y Phelps y Brand, *Methods* 14 (1998), 367-379. Gusanos transgénicos como, por ejemplo, *C.elegans* pueden generarse según se describe en Mello y col., *EMBO J.* 10 (1991), 3959-3970, Plasterk, *Methods Cell. Biol.* 48 (1995), 59-80.

Todas las realizaciones descritas anteriormente pueden no solo usarse para hacer el seguimiento de la diferenciación celular y optimizar las condiciones de cultivo usando moduladores en sus formas puras, sino que el agente o agentes eficaces podrían estar también contenidos en una composición.

Por lo tanto, las composiciones de materia que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico recombinante, células, agregados celulares, o tejidos de la presente invención según se describe en la presente memoria, se incluyen en el ámbito de la presente invención. Según se ha descrito anteriormente, estas composiciones y métodos de la presente invención pueden usarse para diversos propósitos, por ejemplo, para analizar las etapas iniciales de la formación de tejido durante el desarrollo embrionario o la influencia de factores y compuestos en este proceso.

En una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a arrays y chips que comprenden un soporte sólido y, añadidos al mismo o suspendidos sobre las células, agregados celulares o tejidos obtenidos mediante el método de la presente invención o que se encuentran en proceso de diferenciación. Dichos arrays generalmente constan de un sustrato de vidrio, plástico o silicón sobre el cual se depositan los agregados celulares

o tejido en una distribución específica. Dependiendo del tipo de disposición, estas pueden cubrirse de forma adicional con un conductor, p. ej., oro, platino, óxido de indio-estaño, iridio, etc., lo que permite efectuar una medición directa empleando la conductividad de las células. El uso de dichos arrays de microelectrodos coplanares para células cultivadas y agregados celulares como biosensores es de especial interés.

5 Además, la invención se refiere a un aparato para analizar dicha disposición que será capaz de medir la lectura específica del análisis empleado, p. ej., el producto de reacción SEAP, de un modo cuantitativo y asignar los resultados a la posición sobre dicho array.

10 El sistema para hacer el seguimiento de la diferenciación celular según la presente invención también puede emplearse para identificar y caracterizar sustancias que modifican el proceso de diferenciación. Las poblaciones de células diferenciadas y tejidos adecuados para la administración a humanos deben identificarse tras el proceso de diferenciación para evitar administrar células no diferenciadas con un elevado potencial tumorigénico o células diferenciadas en células que no se necesitan para un propósito terapéutico específico. La identificación positiva de células diferenciadas en un tipo celular determinado permite también la optimización de condiciones de cultivo que es necesaria para obtener las cantidades relativamente elevadas de células diferenciadas necesarias para fines terapéuticos. Por lo tanto, es necesario identificar las condiciones para el cultivo de células ES que conducen a su diferenciación en la dirección deseada.

20 En consecuencia, una realización preferida de la invención es un método de obtención y/o perfilado de un modulador de diferenciación celular que comprende:

- poner en contacto una muestra de análisis que comprende una célula, un agregado celular, un tejido u órgano o un animal no humano según se ha definido anteriormente en la presente memoria con una sustancia de análisis; y

25 - determinar el efecto de la sustancia de análisis en la cantidad de producto génico informador o actividad en comparación con una muestra o animal de control.

30 En particular, los métodos de la presente invención pueden usar análisis toxicológicos, embriotóxicos, mutagénicos, y/o teratogénicos in vitro; véase lo mencionado anteriormente en la presente memoria. Otro aspecto importante de la presente invención es, por lo tanto, un método para determinar la toxicidad, preferiblemente la teratogenicidad, embriotoxicidad, toxicidad crónica o aguda de un compuesto que comprende las etapas de los métodos descritos en la presente memoria, en donde un nivel reducido o elevado de actividad de dicho producto de gen informador es un indicador de la toxicidad del compuesto.

35 Los análisis pueden ser análisis "sí/no" sencillos para determinar si hay un cambio en la expresión de la proteína mensajera secretada detectando actividad mensajera, p. ej., la actividad enzimática o la cantidad de proteína mensajera. El análisis puede hacerse cuantitativo comparando la cantidad de actividad y/o cantidad de informador en una muestra de análisis con los niveles de actividad y/o cantidad en una muestra estándar. Según se describe en los ejemplos, el compuesto sometido a análisis o una pluralidad de compuestos sometidos a análisis se someten al test celular, preferiblemente un cuerpo embriode en diferentes concentraciones o series de dilución, preferiblemente a dosis que corresponden a niveles fisiológicos del tipo correspondiente a los compuestos sometidos a análisis; véase también el ejemplo 3. Por lo tanto, es también posible generar fácilmente perfiles de compuesto con una finalidad similar a los descritos en WO00/34525. Por ejemplo, pueden usarse dos o más análisis de modo que para cada análisis las células de análisis o, p. ej., los cuerpos embrioides comprendan moléculas de ADN recombinante con diferentes promotores específicos de la célula y/o específicos del desarrollo unidos operablemente a los mismos o a diferentes codificadores, preferiblemente en donde cada informador es una proteína secretada, p. ej., enzima, más preferiblemente en donde un informador o cada informador es SEAP. Dichos análisis pueden realizarse en paralelo o de forma secuenciada; o los resultados de un análisis pueden compararse con los resultados de un análisis correspondiente realizado en otra parte. Asimismo, está previsto proporcionar y usar células que comprendan dos de las moléculas recombinantes mencionadas pero con diferentes promotores y informadores según se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, puede establecerse un perfil molecular de una composición química sometida a análisis detectando las alteraciones en la actividad génica codificadora o cantidad de proteína codificadora en, por ejemplo, cuerpos embrioides puestos en contacto con la composición química sometida a análisis, según se ha descrito en las secciones anteriores. Una vez determinado el perfil molecular de la composición sometida a análisis, puede compararse con el de una composición química con toxicidades predeterminadas o, preferiblemente, con una biblioteca de perfiles moleculares de composiciones químicas con toxicidades predeterminadas. El resultado de dicha comparación proporciona información para predecir la probabilidad de que la composición sometida a análisis sea tóxica, qué tipo de toxicidad, y cómo de tóxica sería en comparación con otras composiciones tóxicas conocidas.

60

5 Para la finalidad de llevar a la práctica la presente invención, las predicciones de toxicidad de la composición sometida a análisis a partir de sus perfiles moleculares en células ES, tejido, etc., preferiblemente células EB, no tienen por qué tener una exactitud del 100%. Para tener un mayor impacto positivo sobre la eficacia y costes del desarrollo de los medicamentos, solamente debe aumentarse ligeramente la probabilidad de que los candidatos menos tóxicos y, por lo tanto, mejores, aparezcan, por ejemplo, en la mitad superior de una lista priorizada de nuevos candidatos a fármacos.

10 Además, en el ejemplo 3 se ha demostrado que el efecto dependiente de la concentración del compuesto sometido a análisis en la actividad de la molécula mensajera en sobrenadantes de cultivo es consistente con la inhibición dependiente de la concentración de la generación del tipo celular diferenciado mediante el compuesto de análisis. Por lo tanto, es posible también comparar un perfil de compuesto generado con un método de la presente invención con un perfil de compuesto proporcionado por otros medios, por ejemplo, si ambos perfiles cuantifican las células diferenciadas in vitro.

15 Puesto que las células y tejidos obtenidos según la presente invención se asemejan más a la situación in vivo en comparación con los análisis celulares convencionales, se espera que los resultados obtenidos mediante los análisis de la presente invención se correspondan también con la teratogenicidad o embriotoxicidad in vivo de los compuestos sometidos a análisis. La lectura simple del análisis de la molécula mensajera se mide e interpreta más fácilmente que la determinación de la influencia de una sustancia realizando el seguimiento del desarrollo embrional y post-natal de un animal sometido a análisis en todos los aspectos y en etapas diferentes del desarrollo. Esto requiere sacrificar un número de animales a diferentes edades, mientras que empleando la molécula mensajera secretada de modo específico según el desarrollo pueden obtenerse muestras de fluidos corporales del animal de forma repetida permitiendo efectuar el seguimiento a lo largo de un amplio período de tiempo durante toda la vida del animal. Esto reduce también la variabilidad de los resultados del análisis.

25 Pueden combinarse varias sustancias de análisis y añadirse simultáneamente o de forma secuenciada para obtener información acerca de posibles efectos potenciadores o atenuadores. Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención se refiere al método descrito anteriormente, en donde dicha etapa de contacto incluye además poner en contacto dicha muestra o animal de análisis con, al menos, una segunda sustancia de análisis en presencia de dicha primera sustancia de análisis. Dos o más sustancias sometidas a análisis de forma combinada proporcionarán información sobre su interacción en general.

30 Una realización preferida de los métodos según la presente invención incluye añadir un compuesto que según se sabe activa o inhibe el proceso de diferenciación en el medio o animal de cultivo, especialmente si esta sustancia de análisis es un agente terapéutico o una mezcla de agentes terapéuticos. Este rastreo exhaustivo puede hacerse, por ejemplo, porque se sabe que el compuesto tiene un efecto en la diferenciación de determinados tipos celulares y se somete a análisis para determinar su potencial para guiar la diferenciación de otros tipos celulares, o porque un compuesto escogido para tener efectos en otro tipo celular puede tener efectos secundarios no deseados. Este último aspecto aplica especialmente para agentes terapéuticos.

35 Ambos aspectos del rastreo exhaustivo de medicamentos pueden adaptarse para métodos de rastreo exhaustivo de bibliotecas de compuestos así como para rastreo exhaustivo de sustancias químicas industriales. Por lo tanto, otra realización de la presente invención comprende el método descrito anteriormente en la presente memoria en donde, preferiblemente, en un primer rastreo exhaustivo dicha sustancia de análisis está comprendida en un conjunto de sustancias y sometida a análisis como tal. Dicho conjunto de sustancias de análisis, habitualmente una biblioteca combinada de compuestos, puede tener una diversidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 y se acota sucesivamente al ejecutar el método varias veces hasta que se ha reducido la diversidad hasta un factor deseado, preferiblemente hasta un solo compuesto o clase particular de compuestos. De forma opcional, el método de la presente invención puede combinarse con otros métodos de rastreo exhaustivo conocidos en la técnica. En la técnica anterior se describen métodos para la generación y uso de bibliotecas peptidomiméticas combinatorias, por ejemplo, en Ostresh, *Methods in Enzymology* 267 (1996), 220-234 y Domer, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709-715. Descubrimiento de medicamentos mediante bibliotecas combinatorias dinámicas se describe, por ejemplo, en *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002), 26-36 y *Drug Discov. Today* 7 (2002), 117-125. Los compuestos identificados usando el método de la presente invención pueden evaluarse adicionalmente en experimentos simples empleando otros métodos de la presente invención.

40 Se obtienen compuestos y agentes candidatos de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales, o como las sustancias químicas industriales mencionadas; véase lo mencionado anteriormente en la presente memoria. Por ejemplo, se encuentran disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de

oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. De forma alternativa, se encuentran disponibles o pueden producirse fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma bacteriana, fúngica, de extractos de plantas y animales. Por ejemplo, la inhibición de angiogénesis inducida por tumores y la expresión de una metaloproteinasas de matriz en cultivos paralelos de cuerpos embrioides y esferoides tumorales mediante ingredientes de origen vegetal usados en medicina tradicional china ha sido descrita por Wartenberg y col. en Lab. Invest. 83 (2003), 87-98.

Una realización preferida del método de rastreo exhaustivo se lleva a cabo en un array del tipo proporcionado por la presente invención.

Los métodos de array de la presente invención pueden estar en un formato de laboratorio convencional o adaptados para selección de alto rendimiento. La expresión "selección de alto rendimiento" (HTS) se refiere a un diseño de análisis que permite realizar fácilmente análisis de múltiples muestras de forma simultánea y con capacidad de manipulación robótica. Otra característica deseada de los análisis de alto rendimiento es un diseño de análisis optimizado para reducir el uso de reactivo, o minimizar el número de manipulaciones para obtener el análisis deseado. Ejemplos de formatos de análisis incluyen placas de 96 pocillos, 384 pocillos o de más pocillos, gotas colgantes, y chips de tipo microcanal "laboratorio integrado en el chip" usados para experimentos con líquidos. Es bien conocido por el experto en la técnica que a medida que se miniaturizan los moldes de plástico y los dispositivos para manejar líquidos o a medida que se mejoran los diseños de los dispositivos de array, pueden realizarse un mayor número de muestras usando el sistema de la presente invención. En el método de la presente invención, dicha célula o células o tejido están preferiblemente contenidas en un recipiente, por ejemplo, en un pocillo de una microplaca que puede ser una placa de 24, 96, 384 o 1.586 pocillos. De forma alternativa, las células pueden introducirse en un dispositivo basado en principios de microfluídica como, por ejemplo, los proporcionados por Caliper (Newton, MA, EE.UU.). En otra realización preferida, el método de la presente invención comprende realizar 3, 4, 5, 7, 10 o más mediciones, de forma opcional en diferentes posiciones dentro del recipiente.

Los métodos según la presente invención pueden llevarse a cabo también usando células modificadas genéticamente para (sobre)expresar o inhibir la expresión de un gen específico. Ejemplos de células madre modificadas genéticamente se describen en WO03/014326, que proporciona células madre de mamíferos que expresan el receptor VEGF VEGFR-1, o en WO95/06509, que describe células madre hematopoyéticas humanas que expresan constructos de ADN recombinante que codifican una molécula recombinante que contiene una región transductora de señal y una región con especificidad antigénica. De forma alternativa al uso de células madre ya alteradas, dicho gen específico puede transfectarse al mismo tiempo que el constructo de la presente invención confiriendo la expresión de la molécula mensajera secretada.

Puede emplearse también una selección en bibliotecas combinatorias HTS así como formatos de análisis convencionales para identificar compuestos novedosos que tienen un efecto en la diferenciación. Pueden usarse compuestos novedosos así como compuestos previamente conocidos para modular la diferenciación celular para fabricar un medicamento para este fin. Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención es un método de obtención y manufactura de un medicamento que favorece o inhibe la formación de tipos celulares específicos que comprende las etapas de los métodos descritos anteriormente en la presente memoria en donde un nivel de actividad aumentado o reducido del producto génico codificador es un indicador del medicamento.

Los compuestos de interés incluyen numerosas clases de sustancias químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente mediante puentes de hidrógeno, e incluyen típicamente al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos se encuentran también entre biomoléculas, incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

De forma adicional, las bibliotecas y compuestos producidos de forma natural o sintética son fácilmente modificados mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias como, por ejemplo, acilación, alquilación, esterificación, acidificación, etc., para producir análogos estructurales.

Los compuestos pueden incluirse también en una muestra que incluye fluidos a los cuales se han añadido componentes adicionales, por ejemplo, componentes que tienen un efecto en la fuerza iónica, el pH, la concentración total de proteína, etc. Además, las muestras pueden tratarse para lograr, al menos, un

fraccionamiento o concentración parcial. Pueden almacenarse muestras biológicas procurando reducir la degradación del compuesto, p. ej., en atmósfera de nitrógeno, congeladas, o una combinación de las mismas. El volumen de muestra usada es suficiente para permitir una detección medible; habitualmente es suficiente de aproximadamente 0,1 µl a 1 ml de una muestra biológica.

5 Los procesos de diferenciación no solo desempeñan un rol muy importante en el desarrollo embrionario, sino que además son importantes para un organismo adulto puesto que se consigue el reemplazamiento continuo de células senescentes o células dañadas a causa de lesiones o enfermedades mediante células precursoras que se diferencian en las células necesarias. Un aspecto importante de la presente invención es, por lo tanto, un método de fabricación de un agente que favorece la curación de heridas y/o la curación de tejido dañado que comprende las etapas descritas en la presente invención, en donde un mayor nivel o actividad del producto génico informador es un indicador de dicho agente.

15 Los compuestos identificados, aislados y/o producidos mediante los métodos descritos anteriormente pueden usarse también como compuestos candidatos a fármacos en el descubrimiento de medicamentos y preparación de medicamentos o precursores de medicamentos. Esto generalmente incluye modificar el compuesto líder o un derivado del mismo o un compuesto aislado según se ha descrito anteriormente en la presente memoria, por ejemplo, modificando dicha sustancia para alterar, eliminar y/o derivatizar una parte de la misma que según se sospecha causa toxicidad, aumentando la biodisponibilidad, solubilidad y/o período de semivida. En consecuencia, una realización preferida de la presente invención comprende los métodos descritos previamente y modificar adicionalmente dicha sustancia para alterar, eliminar y/o derivatizar una parte de la misma que según se sospecha causa toxicidad, aumentando la biodisponibilidad, solubilidad y/o período de semivida. Los métodos de descubrimiento de compuestos de uso clínico comprenden, por ejemplo, selección de ultra-alto rendimiento (Sundberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000), 47-53) para la identificación de candidatos a fármacos, y diseño de medicamentos basado en la estructura (Verlinde y Hoi, *Structure* 2 (1994), 577-587) y química combinatoria (Salemme y col., *Structure* 15 (1997), 319-324) para la optimización de candidatos a fármacos. Las diversas etapas citadas anteriormente en la presente memoria son generalmente conocidas en la técnica. Por ejemplo, hay disponibles programas informáticos para implementar estas técnicas, p. ej., Rein, *Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions* (Alan Liss, New York, 1989). Los métodos para la preparación de derivados químicos y análogos son bien conocidos para el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Beilstein, *Handbook of Organic Chemistry*, 10 Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 U.S.A., y *Organic Synthesis*, Wiley, New York, USA. Además, puede usarse la peptidomimética y/o el diseño asistido por ordenador de derivados adecuados y análogos, por ejemplo, según los métodos descritos anteriormente en la presente memoria. Los métodos para la generación de candidatos a fármacos en el descubrimiento de medicamentos incluyen también usar proteínas y métodos de detección como, por ejemplo, espectrometría de masa (Cheng y col. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995), 8859-8860) y algunos métodos de resonancia magnética nuclear (RMN) (Fejzo y col., *Chem. Biol.* 6 (1999), 755-769; Lin y col., *J. Org. Chem.* 62 (1997), 8930-8931). Pueden incluir también o depender de análisis de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) (Kubinyi, *J. Med. Chem.* 41 (1993), 2553-2564, Kubinyi, *Pharm. Unserer Zeit* 23 (1994), 281-290) bioquímica combinatoria, química clásica y otros; véase, por ejemplo, Holzgrabe y Bechtold, *Pharm. Acta Helv.* 74 (2000), 149-155.

45 En una realización, el método de la presente invención comprende además mezclar la sustancia aislada o modificada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden encontrarse ejemplos de vehículos y métodos de formulación en Remington's *Pharmaceutical Sciences*.

50 Las sustancias se metabolizan tras su administración in vivo para ser eliminadas por excreción o mediante transformación metabólica en uno o más metabolitos activos o inactivos (Meyer, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 24 (1996), 449-459). Por lo tanto, en lugar de usar el propio compuesto o medicamento identificado y obtenido según los métodos de la presente invención, puede usarse una formulación correspondiente como precursor de medicamento que se convierte en su compuesto activo en el paciente a través de su metabolismo. En fuentes bibliográficas se describen medidas de precaución que pueden adoptarse para la aplicación de precursores de medicamentos y de medicamentos; véase, por ejemplo, Ozama, *J. Toxicol. Sci.* 21 (1996), 323-329.

55 La presente invención también se refiere a un kit que contiene reactivos específicos como, por ejemplo, los descritos anteriormente en la presente memoria útil para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la presente invención descritos anteriormente que contiene, por ejemplo, el constructo génico informador descrito anteriormente en la presente memoria, células multipotentes o pluripotentes, compuestos estándar y, opcionalmente, medio de cultivo, un ácido nucleico recombinante como moléculas ácidas, medios de detección para la molécula codificadora, en particular para SEAP como, por ejemplo, EDTA, L-homoarginina, NBT/BCIP, solución fijadora, solución tampón de incubación, solución salina tamponada con fosfato (PBS), etc. Dicho kit comprendería típicamente un vehículo

compartimentalizado adecuado para mantener en confinamiento próximo, al menos, un contenedor. El vehículo comprendería además reactivos útiles para llevar a cabo dichos métodos. El portador puede también contener un medio para la detección como, por ejemplo, sustratos de enzima etiquetados o similares.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de medicamentos que comprende:

- proporcionar uno o más sistemas de análisis según se ha descrito anteriormente en la presente memoria para identificar un modulador de diferenciación celular; y/o

10 - llevar a cabo el perfilado terapéutico de moduladores identificados en la etapa anterior, u otros análogos de los mismos, para evaluar la eficacia y toxicidad en animales según la presente invención; y

- formular un preparado farmacéutico que incluye uno ó más moduladores que, según se ha identificado en la etapa anterior, tienen un perfil terapéutico aceptable.

15 Utilizando los métodos descritos anteriormente, se determina la identidad de un modulador de diferenciación o un derivado de los mismos. Se identifican los agentes por su capacidad para alterar el nivel de molécula codificadora secretada. Para los compuestos candidatos a fármaco que se han identificado puede llevarse a cabo adicionalmente perfilado terapéutico del agente, o análogos del mismo, para evaluar la eficacia y toxicidad en animales. Los compuestos que tienen perfiles terapéuticos, tras ser ensayados en animales, pueden formularse en preparados farmacéuticos para usar en humanos o para usos veterinarios. El método de negocio de la presente invención puede

20 incluir una etapa adicional de establecimiento de un sistema de distribución para distribuir el preparado farmacéutico para la venta y puede incluir opcionalmente establecer un grupo de venta para comercializar el preparado farmacéutico.

25 En lugar de desarrollar los agentes de modulación de la diferenciación celular identificados en la propia empresa, puede obtenerse un desarrollo adicional del medicamento por parte de una empresa diferente. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de medicamentos que comprende:

30 - proporcionar uno o más sistemas de análisis según se ha descrito anteriormente en la presente memoria para identificar moduladores de la diferenciación celular;

- (opcionalmente) llevar a cabo el perfilado terapéutico de moduladores identificados en la etapa anterior para eficacia y toxicidad en animales según la presente invención; y

- conceder, a una tercera parte, los derechos para el desarrollo posterior del medicamento y/o ventas para los moduladores identificados en la primera etapa, o análogos de los mismos.

35 - Para compuestos candidatos a fármacos adecuados que han sido identificados puede llevarse a cabo un perfilado posterior del agente, u otros análogos de los mismos, para evaluar la eficacia y toxicidad en animales, dependiendo de las modalidades del acuerdo con la respectiva tercera parte. El desarrollo posterior de dichos compuestos para usar en humanos o para usos en veterinaria será llevado a cabo por la tercera parte. El método de negocio de la presente invención implicará generalmente la venta o cesión de los derechos de desarrollo de dicho compuesto, pero puede llevarse a cabo también como un servicio ofrecido a compañías para el desarrollo de medicamentos de

40 forma gratuita.

45 La presente invención también se refiere a moduladores de diferenciación celular que se han identificado usando los métodos descritos anteriormente en la presente memoria, así como a composiciones farmacéuticas para usar en la modulación de la diferenciación celular que comprenden dicho modulador.

50 El modulador según la presente invención puede combinarse con diluyentes o vehículos adecuados, preferiblemente los que son farmacéuticamente aceptables. Pueden encontrarse ejemplos de dichos vehículos, diluyentes y métodos de formulación en Remington's Pharmaceutical Sciences. Para formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración eficaz, dichas composiciones contendrán una cantidad eficaz del modulador. Los vehículos o diluyentes son generalmente estériles y no tóxicos, y se definen como vehículos usados habitualmente para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o a humanos. El diluyente se selecciona de modo que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes son

55 agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir también otros vehículos, adyuvantes, o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunológicos y similares. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de modulador que es suficiente para lograr el efecto deseado en la diferenciación de células diana.

60 Ejemplos adicionales de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones

5 salinas, emulsiones como, por ejemplo, emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales bien conocidos. Por tanto, la presente invención también proporciona un método para fabricar una composición farmacéutica para usar en la modulación de la diferenciación celular que comprende mezclar un modulador de la diferenciación celular identificado según un método de la presente invención con un diluyente o vehículo adecuado.

10 El uso de un constructo génico informador, una célula, un agregado celular, tejido, órgano, implante o trasplante, un animal no humano, una composición, un array o el equipo definido en la presente memoria en el descubrimiento de medicamentos o en el perfilado farmacocinético o farmacológico es también una realización preferida de la presente invención. Por lo tanto, los medios y métodos de la presente invención descritos anteriormente en la presente memoria pueden usarse en una variedad de aplicaciones incluyendo, aunque no de forma limitativa, análisis de "pérdida de función" con células ES que contienen mutaciones homocigóticas de genes específicos, análisis de "ganancia de función" con células ES que sobre-expresan genes exógenos, análisis del desarrollo de compuestos teratogénicos/embriotóxicos in vitro, análisis farmacológicos y el establecimiento de sistemas de modelo para funciones celulares patológicas, y aplicación de factores de diferenciación y crecimiento para la inducción de células diferenciadas selectivamente que pueden usarse como fuente para injertos de tejidos; véase, p. ej., Guan y col., Altex 16 (1999), 135-141.

20 Según se ha descrito en los ejemplos, para la expresión de la proteína fosfatasa alcalina secretada (SEAP) de placenta humana, se ha usado un promotor específico, es decir, la región promotora del gen de cadena pesada alfa-miosina de ratón; véase NCBI GenBank núm. de registro U71441 (SEQ ID NO: 1). Según la presente invención, podría mostrarse que esta región promotora es especialmente adecuada para la expresión específica del tipo celular de un gen codificador, especialmente para los propósitos de la presente invención. Además, experimentos adicionales llevados a cabo según la presente invención revelaron de forma sorprendente que el promotor de gen de cadena larga regulador de la miosina ventricular de ratón (véase NCBI GenBank núm. de registro AF302688; SEQ ID NO: 2) es particularmente adecuado para la expresión del gen informador también. Por lo tanto, la presente invención se refiere también a una molécula de ADN recombinante según se ha descrito anteriormente en la presente memoria en un sistema codificador específico del tipo celular que comprende el gen de cadena pesada de alfa-miosina de ratón y/o del gen de cadena ligera regulador de miosina ventricular de ratón, en especial la secuencia representada en NCBI GenBank núm. de registro U71441 (SEQ ID NO: 1) y AF302688 (SEQ ID NO: 2), respectivamente, o un fragmento de la misma. Típicamente, la molécula de ADN recombinante es un vector y comprende otra secuencia de ADN funcional como, por ejemplo, ori, marcador bacteriano seleccionable, señal de poliadenilación, sitios de clonación múltiple, y similares. Por lo tanto, dicho vector puede también usarse para expresar específicamente, por ejemplo, factores de crecimiento y similares o ADNc diana para determinar su función durante el desarrollo celular. Por lo tanto, la presente invención incluye el uso de las regiones promotoras mencionadas para la expresión de una secuencia de ADN que codifica una proteína mensajera o un marcador que puede seleccionarse; véase lo mencionado anteriormente en la presente memoria. En una realización específica, la presente invención se refiere al vector de expresión descrito en el ejemplo 1 que comprende la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO: 3, así como a un vector correspondiente, en donde el promotor de gen de cadena pesada alfa-miosina de ratón se ha reemplazado por el promotor génico de cadena ligera regulador miosina ventricular de ratón, y su uso en las realizaciones descritas anteriormente.

45 Estas y otras realizaciones se describen y se incluyen en la descripción y ejemplos de la presente invención. Puede obtenerse información adicional correspondiente a cualquiera de los materiales, métodos, usos y compuestos para emplear según la presente invención a partir de fuentes bibliográficas públicas y bases de datos, usando, por ejemplo, aparatos electrónicos. Por ejemplo, puede usarse la base de datos "medline", que es alojada por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los EE.UU. y/o la Biblioteca Nacional de Medicina de los Institutos Nacionales de la Salud de los EE.UU. Otras bases de datos y direcciones web como, por ejemplo, las del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), que es parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), son conocidos para el experto en la técnica y pueden obtenerse también usando motores de búsqueda de internet. En Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 se presenta una visión general sobre información de patentes en biotecnología y una visión de conjunto de fuentes relevantes de información de patentes útiles para búsqueda retrospectiva y para un manejo inteligente de la información.

55 La descripción anterior describe de modo general la presente invención. Puede obtenerse una visión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos y a la figura que se proporcionan en la presente memoria con fines ilustrativos únicamente y sin que previsiblemente limiten el ámbito de la invención. Los contenidos de todas las referencias mencionadas (incluyendo las referencias bibliográficas, las patentes publicadas, las solicitudes de patente publicadas según se ha mencionado a lo largo de esta solicitud y a las especificaciones, instrucciones, etc.,

del fabricante) se incorporan expresamente mediante referencia a la presente invención; sin embargo, no se reconoce que ningún documento citado sea de hecho técnica anterior con respecto a la presente invención.

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que forman parte de la técnica.

Para la elaboración posterior de técnicas generales relativas a la tecnología de las células madre, el técnico puede consultar los libros de texto y publicaciones estándar, por ejemplo, *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach* (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); *Guide to Techniques in Mouse Development* (P. M. Wasserman y col., eds., Academic Press 1993); *Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro* (Wiles, Meth. Enzymol. 225 (1993), 900.); *Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (Rathjen y col., *Reprod. Fertil. Dev.* 10 (1998), 31). La diferenciación de células madre se trata en Robertson, *Meth. Cell Biol.* 75 (1997), 173; y Pedersen, *Reprod. Fertil. Dev.* 10 (1998), 31. Además de las fuentes de células madre ya descritas anteriormente en la presente memoria, se proporcionan otras referencias; véase Evans y Kaufman, *Nature* 292 (1981), 154-156; Handyside y col., *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196 (1987), 185-190; Flechon y col., *J. Reprod. Fertil. Abstract Series* 6 (1990), 25; Doetschman y col., *Dev. Biol.* 127 (1988), 224-227; Evans y col., *Theriogenology* 33 (1990), 125-128; Notarianni y col., *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 43 (1991), 255-260; Giles y col., *Biol. Reprod.* 44 (Suppl. 1) (1991), 57; Strelchenko y col., *Theriogenology* 35 (1991), 274; Sukoyan y col., *Mol. Reprod. Dev.* 93 (1992), 418-431; Iannaccone y col., *Dev. Biol.* 163 (1994), 288-292.

Se describen de forma general métodos de genética molecular e ingeniería genética en las ediciones actuales de *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Sambrook y col., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press); *DNA Cloning, Volumes I and II* (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller & Calos, eds.); *Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edition (F. M. Ausubel y col., eds.); y *Recombinant DNA Methodology* (R. Wu ed., Academic Press). *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, vols. 154 y 155 (Wu y col. eds.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press.; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N. Y.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London; *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986). Reactivos, vectores de clonación, y kits para manipulación genética a los que se hace referencia en esta descripción son comercializados, por ejemplo, por BioRad, Stratagene, Invitrogen, y Clontech. Se ofrece una idea general acerca de técnicas generales de cultivo celular y colección de medios en *Large Scale Mammalian Cell Culture* (Hu y col., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (1997), 148); *Serum-free Media* (Kitano, *Biotechnology* 17 (1991), 73); *Large Scale Mammalian Cell Culture* (*Curr. Opin. Biotechnol.* 2 (1991), 375); y *Suspension Culture of Mammalian Cells* (Birch y col., *Bioprocess Technol.* 19 (1990), 251). Marshall McLuhan y Fred Allen han realizado otras observaciones sobre los medios y su impacto en el medio de cultivo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: generación de un vector para la expresión de SEAP con especificidad cardíaca

Mediante el uso de procedimientos de clonación estándar se obtuvo un vector de expresión de SEAP del siguiente modo. Se insertó un fragmento de 5,4 kb que contenía la región promotora del gen de la cadena pesada de miosina de ratón (banco de genes núm.) U71441 en el poliligando del vector pEGFP-1 (Clontech). El gen de cadena pesada α -miosina se expresa de forma específica mediante miocitos cardíacos en células ES que se están diferenciando (Gulick y col., *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 9180-91855; Palermo y col., *Cell Mol. Biol. Res.* 41 (1995), 501-519; Morkin, *Microsc. Res. Tech.* 50 (2000), 522-531; Boheler y col., *Circ. Res.* 91 (2002), 189-201). Posteriormente, la secuencia codificadora de EGFP se eliminó y reemplazó por una secuencia codificadora SEAP (Berger y col., *Gene* 66 (1988), 1-10).

El vector resultante, designado α -MHC-SEAP, contiene por lo tanto el gen SEAP bajo el control transcripcional de un promotor con especificidad para el corazón. Otras características del vector incluyen la presencia de una secuencia de consenso Kozak para permitir la traducción eficaz del ARNm de SEAP, la presencia de señales de poliadenilación de SV40 que dirigen el procesamiento adecuado del ARNm de SEAP, la presencia de casetes de resistencia de neomicina que contiene el promotor inicial SV40, el gen de resistencia a neomicina/kanamicina de Tn5 y señales de poliadenilación del gen de timidina-quinasa del virus Herpes simplex para permitir la selección de células ES transfectadas de forma estable, y la presencia de un promotor bacteriano aguas arriba de este casete para conferir resistencia a quinamicina en *E.coli*.

Ejemplo 2: generación de células ES transfectadas

El vector α -MHC-SEAP se linealizó por digestión con endonucleasa de restricción y se introdujo en células madre embrionarias (ES) de ratón D3 (American Type Culture Collection) mediante electroporación. Después de la selección con neomicina, las colonias de células ES sencillas se aislaron y expandieron. El cultivo de células ES y la transfección, así como la selección de transfectantes estables se hizo usando procedimientos estándar (Torres y Kiihn, Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press, (1997) New York).

Ejemplo 3: diferenciación de células ES en células cardíacas en presencia de ácido retinoico

La presencia de exceso de ácido retinoico tiene efectos asombrosos en el desarrollo inicial del corazón in vivo (Osmond y col., Development 113 (1991), 1405-1417; Yutzey y col., Development 120 (1994), 871-883; Dickman y Smith, Dev. Dyn. , Dev. Biol. 188 (1997), 205-215). Además, el ácido holo-trans-retinoico (CAS No. 302-79-4) mostró inhibición de la generación de cardiomiocitos de células ES in vitro (Seiler y col. ALTEX 19 Suppl. 1 (2002), 55-63). Por lo tanto, las células ES transfectadas establemente con el vector α -MHC-SEAP se trataron con ácido retinoico a diferentes concentraciones y se sometieron a un protocolo de diferenciación que resultó en la generación de células cardíacas. Si la actividad del informador secretado, aquí SEAP, puede realmente usarse para cuantificar los cardiomiocitos derivados de células ES, la cantidad de actividad de SEAP en sobrenadantes de cultivos debería ser inversamente proporcional a las concentraciones de ácido retinoico presentes en los cultivos.

Todas las incubaciones de cultivos celulares se llevaron a cabo a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂

Agregación de células ES

Las células ES transfectadas establemente con el vector α -MHC-SEAP (véase el ejemplo 2) se tripsinizaron para obtener una única suspensión celular. Se recogieron células mediante centrifugación (800 g durante 5 min) y se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Invitrogen) suplementado con 20% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen) a una densidad de 2×10^6 células/ml. Para agregar las células ES, se incubaron 4 ml de esta suspensión en un plato bacteriológico de 6 cm (Greiner) sobre una plataforma basculante (GFL 3006) con agitación (50 r.p.m.). Al cabo de 6 horas, se añadieron 2 ml de este cultivo a 13 ml de IMDM que contenían 20% de suero fetal bovino (FBS) en un matraz T25 (Falcon). El matraz se incubó en agitación (50 r.p.m.; GFL 3006) durante 18 horas.

Durante este procedimiento se formaron agregados de células ES (cuerpos embrioides, EB).

Diferenciación de células ES en presencia de ácido retinoico:

Se disolvió ácido holo-trans-retinoico (sigma) en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) para obtener soluciones madre de 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, y 10^{-9} M. En placas de petri de 10 cm (para análisis bacteriológico, Greiner) se preparó un medio compuesto de medio de cultivo IMDM suplementado con 20% de FBS y ácido retinoico añadido con las soluciones madre anteriormente indicadas para obtener concentraciones finales de 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, y 10^{-12} M de ácido retinoico, respectivamente. En una placa se introdujo DMSO (concentración final de 0,1 % (v/v) sin ácido retinoico (disolvente de control). Cada placa contenía 10 ml de medio. Se transfirieron 70 EB a cada placa de petri y se incubaron durante 4 días.

Posteriormente, se transfirieron EB a placas de 6 pocillos (placas para cultivo de tejidos; Becton-Dickinson). Cada pocillo contenía 3 ml de IMDM con 20% de FBS y ácido retinoico y DMSO, según se ha descrito anteriormente para el cultivo en placas de 10 cm. Se establecieron 2 pocillos para cada concentración de ácido retinoico y 2 pocillos como disolventes de control. A cada pocillo se transfirieron 20 EB desde la placa de 10 cm correspondiente. Las placas se incubaron durante 7 días. Posteriormente, se intercambié medio de cultivo con 2 ml de knockout™ D-MEM (Invitrogen) suplementado con 20% (v/v) de knockout™ D-MEM (Invitrogen). Se recogieron muestras de sobrenadantes de cultivo celular tras la incubación de EB durante dos días más.

Determinación de la actividad de SEAP

Las muestras se sometieron a análisis para determinar la actividad de SEAP usando el kit de detección de fluorescencia Great EscAPe SEAP (Becton-Dickinson) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se midió usando un lector de microplacas (Safire, Tecan). La actividad de fondo se determinó sometiendo a análisis una muestra de medio fresco (knockout™ D-MEM suplementado con 20% (v/v) de knockout™ SR).

Los resultados se muestran en la Figura 1. Las concentraciones de ácido retinoico inferiores a 10^{-9} M no tuvieron ninguna influencia en la actividad de SEAP en comparación con los controles. La actividad de SEAP disminuyó drásticamente para una concentración de ácido retinoico de 10^{-8} M. A concentraciones superiores no se observó actividad.

5 Por lo tanto, se observa claramente un efecto dependiente de la concentración del ácido retinoico en la actividad de SEAP en sobrenadantes de cultivos. Además, estos datos son consistentes con la inhibición dependiente de la concentración de la generación de cardiomiocito por parte del ácido retinoico descrita anteriormente (Seiler y col., 2002, mencionado anteriormente). Por lo tanto, los resultados indican que el sistema informador descrito en la presente memoria para cuantificar los cardiomiocitos derivados de células ES son adecuados y útiles para hacer el seguimiento del proceso de diferenciación de las células ES.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Axiogenesis AG
 <120> Proteínas secretadas como marcadores para la diferenciación celular
 <130> AX02A03/P-WO
 <160> 4
 <170> PatentIn versio 3.1

20 <210> 1
 <211> 5443
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> promotor
 <222> (1)..(5443)
 <223> gen de cadena pesada alfa miosina, región promotora

30 <220>
 <221> promotor
 <222> (2)..(5442)
 <223> región promotora contenida en la SEQ ID NO 3

35 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (4369)..(4389)
 <223> exón 1

40 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (5071)..(5139)
 <223> exón 2

45 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (5431)..(5443)
 <223> exón 3

50 <400> 1

ggatctgca aggtcacaca agggctcca cccaccaggt gccctagtct caattcagt 60
 ttccatgct tggctcaca atgctggcct cccagagct aattggact ttgtttttat 120
 ttcaaagg cctgaatgag gagtagatct tgtgctacc agctctaagg gtgcccgta 180
 55 agccctcaga cctggagcct tgcaacagc ccttaggtg gaagcagaat aaagcaatt 240
 tcctaaagc caaatcctg cctctagact ctctctct gacctggc cctgggctct 300
 aggggtggga ggtgggctt ggaagaaga ggtgggaag tggcaaaagc cgatccctag 360
 ggccctgta agtccgagc ctccctgta cagcactggc tcatagatcc tcctccagcc 420
 aaacatagca agaagtgata cctccttgt gacttccca ggcccagtac ctgtcaggtt 480
 60 gaaacaggat ttagagaagc ctctgaactc acctgaactc tgaagctcat ccaccaagca 540

agcacctagg tgccactgct agttagtctc ctacgctgat aatatgcaga gctgggccac 600
 agaagtctcg ggggttagga actgaccagt gactttcag tcggcaaagg tatgacccc 660
 tcagcagatg tagtaatgtc cccttagatc ccatcccagg caggtctcta agaggacatg 720
 5 ggatgagaga ttagtcatg tgccattcca aacacagcta tccacagtgt ccctgcccc 780
 ttccacttag ccaggaggac agtaacctta gcctatctt ctctctccc atcctcccag 840
 gacacacc ctggctgca gtattcatt ctctctcac gtcccctcg tgacttccat 900
 ttgcaaggct ttgacctct gcagctgctg gaagatagag ttggcccta ggtgtggca 960
 gccatctcaa gagaaagcag acaacagggg gaccagattt tgaagatc aggaactaaa 1020
 10 tcactggcgg ccctgggggt agaaaaaaga gtgagtgagt ccgtccagc taagccaagc 1080
 tagtccccga gatactctgc cacagctggg ctgctcgggg tagcttagg aatgtgggtc 1140
 tgaagacaa tgggattgga agacatctct ttgagtctcc cctcaacccc acctacagac 1200
 aactctgtg ttggccgac tctgttcaa cagccctctg tgttctgacc actgagctag 1260
 gcaaccagag catgggcct gtgctgagga tgaagagtg gttaccaata gcaaaaacag 1320
 15 caggggaggg agaacagaga acgaaataag gaaggaagaa ggaaaggcca gtcaatcaga 1380
 tgcagtcaa agagatggga agccaacaca cagctgagc agaggaaaca gaaaaggag 1440
 agattctggg cataaggagg ccacagaaaag aagagcccag gcccccaag tctctctt 1500
 atacctcat ccgtctccc aattaagccc actctctc ctgatcaga cctgagctgc 1560
 agcgaagaga ccgtaggga gcatcacact ggatgaagga gatgtgtgga gaagtccagg 1620
 gcaacctaa agccagagcc taaaagagca agagataag gtgctcaaa ggtggccagg 1680
 20 ctgtgcacac agagggctga gactgggtg tagagccta agataaggat gatgctcaga 1740
 atggcgggg ggggggattc tgggggggg agagagaagg tgagaaggag cctggaacag 1800
 agaacttga agcgtgga acgataccat aaaggaagga accaggcta ccttctctg 1860
 taaatcatga aagacagga gaaggaagc tggagagagt agaaggacc cggggcaaga 1920
 catggaagca aggacaagcc aggtgagcg ctccgtgaaa tcagcctgct gaaggcagag 1980
 25 ccctggtatg agcaccagaa cagcagagcc tagggttaat gtcgagacag ggaacagaag 2040
 gtagacacag gaacagacag agacggggga gccaggtaac aaaggaatgg tcttctcac 2100
 ctgtggccag agcgtccatc tgtgtccaca tactctagaa tgttcatcag actgcagggc 2160
 tggcttggga ggcagctgga aagagtatg gagagccagg ggagacaagg gggcctagga 2220
 aaggaagaag agggcaaac aggccacaca agagggcaga gcccagaactgagttaact 2280
 30 ctctctgtt gcatctcca taggagcag tgggaactct gtgaccacca tccccatga 2340
 gccccacta cccatacca gtttggcctg agtggcattc taggtccct gaggacagag 2400
 cctggcctt gtctctgga cctgaccaa gctgaccaa tgttctcagt acctatcat 2460
 gcctcaaga gcttgagaac caggcagtga catattaggc catgggctaa ccctggagct 2520
 tgcacacagg agcctcaagt gacctccagg gacacagctg cagacagggt gcctttatc 2580
 35 ccaaagagca accatttggc ataggtggtc gcaaatggga atgcaagggt gaatcaggtc 2640
 cctcaagaa tcatgtatg aagacctaa accctggag agaggggat gctctgccc 2700
 cccccacca taaggggagt gaactatct agggggctg cgacctggg gagacaccac 2760
 attactgaga gtgctgagcc cagaaaaact gaccgccctg tgtctgccc acctccacac 2820
 tctagagcta tattgagagg tgacagtaga tagggtggga gctgtagca gggagagtgt 2880
 40 tctgggtgt gagggttag gggaaagcca gagcagggga tctggtctt gtctctgaa 2940
 cacaatgtct acttagttat aacaggcatg acctgctaaa gacccaacat ctacgacctc 3000
 tgaagagaca gcagccctg aggacaggg ttgtcttga gcctgggtg cttgatggtg 3060
 ccacaaagga gggcatgagt gtgagtataa gccccagga gcgttagaga agggcacttg 3120
 ggaaggggtc agtctgcaga gccctatcc atggaatctg gagcctgggg ccaactggtg 3180
 45 taaatctctg ggctgcccag gattcaaaag cagcacctgc atcctctggc agcctgggga 3240
 ggcggaaggg agcaacccc cactatacc ctctctccct cagccccagg attaacacct 3300
 ctggccttc ccctcccac ctccatcag gagtggaggg ttgagaggg agggtaaaaa 3360
 cctacatgtc caaacatcat ggtgcacgat atatggatca gtagttagg aggcaagaaa 3420
 ggaatctga aggctaact gggtaatgt gtaaagtctg tgtcatgtg tgtgtgtg 3480
 50 actgaaaacg ggcattgctg tgcagctgt cagttctgt cgtgaggta ccagactgca 3540
 ggttgtgtgt taaattgcc aaggcaaat gggtaatcc ctccatggt taaagagat 3600
 tggatgagg cctgcatctc aaggacctg gaaaatagaa tggacactct atatgtgtct 3660
 ctaagctaag gtagcaagg ctttggagga cacctgtcta gagatgtgg caacagagac 3720
 tacagacagt atctgtacag agtaaggaga gagaggaggg ggtgtagaat tcttacta 3780
 55 tcaagggga actgagctg gcacctgcaa agtggatgct ctccctagac atcatgactt 3840
 tgtctctgg gagccagcac tgtggaact caggtctgag agagttagg gctcccctca 3900
 gcctgaagct atgcagatag ccaggggtga aaggggaag ggagagcctg gtagggagc 3960
 ttgtgtgtg gaggcaggg acagatatta agcctggaag agaagtgac cctaccag 4020
 ttgtcaact cacctcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt aggggaggtg 4080
 60 ggtgagacg ctctgtctc tctctatct cccatcggc ctttgggga ggaggaatgt 4140

gccaagac taaaaaagg ccatggagcc agaggggca gggcaacaga ctttcatgg 4200
 gaaacctg gggccctgt gtctcctgt cacctccaga gccaaggat caaaggagga 4260
 ggagccagga caggaggaa gtggaggga gggcccagc agaggactcc aaatttagc 4320
 5 agcaggcata tggatggga tataaaggg ctggagcact gagagctgc agagattct 4380
 ccaaccagg taagaggag ttcgggtg gggctctca cccacaccag accttcccc 4440
 acctagaagg aaactgcct tctggaagt ggggtcagg ccggtcagag atctgacagg 4500
 gtggcctcc accagcctg gaagtctca gtgcaggag gttccaca gaaactgg 4560
 atgccctc cctacgct tcttccat ctctcctg gggatgctc tcccgtct 4620
 ggttatct ggctctgt ctcagcaag attgcccgt tctgtccac tccatcttc 4680
 10 tctactgt cctgctgt cctgcctc tgcgtgctc tctctcca cccattctc 4740
 acttcactt tctccctt ctatttga tcatcctc ctctctct tcttcttc 4800
 ctctctct tcttctc tttctcct tcttcttc ctctctct tcttcttc 4860
 ctctctct gtgtcagat gctgagaat acacctggg tcccacct tatgtaaca 4920
 atctccagt gagccacag ttcagtctg ctgggtgctc tttacctc ctcaccct 4980
 15 ggctgtct gttcatct ggtcaggat tctagattg tctccagcc tctgtactc 5040
 ctctctgc ctgtctct ctctgtccag ctgcgccact gtgggcctc gttccagctg 5100
 tggccacat tctcaggat tctgaaaa gtaaccagg tgagaatgt tcccctgtg 5160
 acagcagat acgattctc cggaagtcag gctccagcc ctctcttct ctgccagct 5220
 gccggcact cttagcaaac ctacggcacc ctaccacc atagacctt gacagagaag 5280
 20 caggcactt acatggagtc ctgggggag agccataggc tacgggtgaa aagaggcagg 5340
 gaagtggtg tgtaggaaag tcaggactc acatagaagc ctagcccaca ccagaatga 5400
 cagacagatc cctctatct ccccataag agtttgagc gac 5443

<210> 2
 25 <211> 6298
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 30 <221> promotor
 <222> (1)..(5445)
 <223> gen de cadena ligera regulador de la miosina ventricular (AF302688)

<220>
 35 <221> 5'UTR
 <222> (5446)..(5486)
 <223> exón 1

<220>
 40 <221> exón
 <222> (5487)..(5489)
 <223> exón 1

<220>
 45 <221> exón
 <222> (6209)..(6298)
 <223> exón 2

<400> 2
 50 ctgagtgct gggattaaag gcatgcacca ccatgctcag cctgtttct ttttaagag 60
 ttaatcttt taattatgt tatgtatgc ttgcatgga tatgccacg agagtgatg 120
 tgcctggaa gaccagaagg ggggacaaa cccctgcagt ttgagcctc ctggcctggg 180
 tgctgggaat caaactaat ttcttagaa gacgagatc ctctaacac ccaagccctc 240
 55 ttgcagccc ttatttgt ttggtggtg gttttgcca aagctaggag ttccagccc 300
 agtctttat actctgcct catggctct gacatcca actctgccag gggctgactc 360
 ttatctcag aaagcaattg ttactttgac cccagcagt gctgagccac caccagggc 420
 ctgaggctag aagaaaatg accctctc catggtcatc tcagaaagc acttgaacc 480
 caggtaaagg tagcaggtcc aggttcagat gtatgtcca cagcctgtgc aaaaaggacc 540
 60 ctctactcc aagctgccc cacctgatca gacctctc cagatctggg ggaaacgga 600

gcaggctct caccacaaca ggagtcccca gggcacacaa gatattgcct ttgattttgt 660
 ccttatgaca accctgcgaa taaaatcgtc atcatgcca ctctacagat tagaatactg 720
 aagctgagag caaaaaccta cctgatgtca cactgctgct caatgactaa gcaacgaaaa 780
 5 tcaaaagtga atattcccg aggctccagt ctgacagatg acaaatgctc tgcaccgctc 840
 acattgggt ccatgttctg aaatcctctg tttcacctc cctagaacc cagatagtac 900
 ctaaatagct gagtccattc acctggccct ggctttctgc taaggaatat gtcagacatc 960
 ttcaggattc tcaaaacttg ttctgagtag aaatccttc aggcctggga gctgttctc 1020
 ctacagagaa agccccatg tggcacaggc caactcccc acaaccagaa ccatcatcag 1080
 tcacaactgc actctctc atgccgaaga aactttttt ttcagtctg gatggatgct 1140
 10 ggaaccatcg gatcctgtaa cccgctctc cacctccagt acagacgtca ggacttgag 1200
 ctccctccg ctgctctct ctgactgca ctgaattc cctgagggtt ggcattggg 1260
 gttttgtt ggctgttc ttgctgccc tagaggaata atcaatgctt aggttttaa 1320
 tagcaaaggc attagtggg tcaaccaagc actcaggaga tagacaggag gtcagaatt 1380
 caaggtcact cttgctaca caatgagtc aggtcagcc tgggtacac gagatccaat 1440
 15 tcaaaataaa caaaaataa aataattgat atctctc tgatattat agttactg 1500
 tagactgtt ggatacatt ctcaagagt ctcaaagtc atctccactg agttaataa 1560
 tgtgttact ataacacaac actagagctt ggttcgtta caaatacaaa agatttatt 1620
 tgggctggag agatggctca gagctgact ctctccaaa ggtcctgagt tcaatcca 1680
 gcaaccacat gttggctcga aaccatctg aatgggatct gatgcctct ttagtggt 1740
 20 ctgaagacag ctatgggtga ctacataca taaaataaat aataaatct taagagagag 1800
 atttgttct acaaggcta gatgctactg agagtaaagg gttagaact cgttttct 1860
 ctctacta actactaat cccatcttg ggggggag ggaagctc atgactcac 1920
 ctacactctg taccctcc tagacttac ctctatcgc taccaatctc tgattggg 1980
 atcaaattt caaccagga gcttaggga gacaaatga aaccagta tcccctgact 2040
 25 cccggtgac actgatct gacacagta gggctccat aaactgaa agtcttaga 2100
 atgggggcaa aatcatttt gtgttataa atatgacca catgttctc catctttaa 2160
 aattgcaga gtaattctc tctctctc tctctctc tctgtgtg tgtgtgtc 2220
 tgtgtctg tgtgtctg tgtgtctg tgtgtctg tgtgtgta ctacatcca 2280
 agtgggttg ggtactgct atgtggacat gtatgttg gtagaagca gaagtcaacc 2340
 30 ttgtgtga tttctcagag gtgatcact ttttttg agacagggc tctactgag 2400
 gccgggact tactgtttt aggttacac tctggccag caagccagag agaccgagag 2460
 agacggctg tctcatctc tccagcaca ggttcaga cccacaccac catgccagc 2520
 ttgatgtg gctgggtt tgagagtag aatcaggac ctctgctga gccatctcc 2580
 cagccactga acataatca tatataatct ggctttgt cttttgtg gtgacgggtg 2640
 35 tgtttgtt tttcttgc tgtattat tctgtcatt taagctttt tttttgtg 2700
 ctacctgga gggactga acagcagaa agccagggc gaggctcac tgatgggat 2760
 ttgagcccg gaatgctgg agctgccc agctgaaag ggcaaaggaa aggactgtc 2820
 ccgcatccac ggtggagca gccctctcc cgattctat ttctggccac cagctctgc 2880
 aggtagcag ctggctgct ctgagctgc tgggttgc gttgtattt cctactagca 2940
 40 tgggaaagc tgatcagct cttttgtt caattgtcc agaagctct cgggtccc 3000
 ccaggactcc tgatctct ctccgtgga ctggggctg gcttcaaa ttctaggctg 3060
 cagaaatct acaagcag gatcttag tcccagggtg gatgtccacc aagagcccag 3120
 ggacaaagca ttgacagct ctgtgtgc cacgtctcc cccacccca cccatcccc 3180
 caggaaactg gagaggagt cagagccc ccccaggcc ttccaacaa ggactctgg 3240
 45 aggaccctg ggttttaac accaatcac caaatgttc ccacgagca acacaaacca 3300
 gctctctc atacagcag gtggccagt ggaccatgg gacaggtac ctctgtggc 3360
 ccaggctcac gtaaaactc aacctaatc ttagcctcc cacagccatt tgcgggtac 3420
 ctgctctc agccaccgt tggcactg caagcacgt gtcctcaac acaataagaa 3480
 gccaaaggaa tagggctt gcttaactg tacagcagt tagccaagc tagcctgaa 3540
 50 ctactatg agcaaggac gatcataaac tctgatcct cccgctcag agtctgggt 3600
 gttgagataa caggtgtgg tactcccta ccttctt aatagcaatc aatgtgtggc 3660
 cacatgtt tgcctcac attaaaacca tctgacctg aggacgaaat gactaacagt 3720
 tgcctctga aggttctg gatctatc ttataatcc agcaatcaag gggagtggg 3780
 gatcaggagt tcaaatcag cccagcctg gctacatgac accctgtctt gaaaaatga 3840
 55 ggaattaagc tggcgctgt gccgactcc ttaatcca gacttggga gtagaggca 3900
 ggcggactc tgagtctg gccagcctg tctacaagt gacttccag acagccacag 3960
 ctatacagag aaacctgct tcaaaaaacc agaaagaaag aaagagagaa agaaagaaag 4020
 aaagaagaa agaaagaaag aaagaagga aggaaggaag gaaggaagaa aaggaagaa 4080
 ggaaggaag aaagaagaa agaaagaaag aaagaagac agacagaaag aaaggttagg 4140
 60 aaagaagaa aggaagaaag agaaagaaag aaagaagaa agaaagaaag aaagaagaa 4200

agacagaaag aaaggttgg aaagaagaa aggaaaagaa agaagaaag agagaaagag 4260
 agaaagaaag aaagaaaaga aaagagagaa aagaaaagaa aagaaaagaa aagaaaagaa 4320
 agaaaaaaaa gaaaagaaa gaaagaaaag aaaaggaagg aagaaaagaa aagaaaaatg 4380
 gaggagtaa cctatgttt cctttttt tattcatcat tggtaggct atcctcagct 4440
 5 acatatcaag tcaagccag cctgggctac atgagaccct gcctcaaaaa agaaaaggag 4500
 ccagtgtagc gacatactcc cgtcctcca gcaactggga gacagaggct actccactgc 4560
 tgtctccagc agccggcctg cctccctgag cctcatttt tcataacat ggggaccaa 4620
 ctgctaaggt gaccctgct ccatggggg actggagact tgagagtga ggggtatca 4680
 tttgtccagt ctgtgaacaa atggcagcct ccaaggtggt tttgtgtca aaggaggaca 4740
 10 tgggacaggg agaggccagg gagaagagcc caccctcagg agtaggctgt ccccgtgaag 4800
 ctgggtgggg acaaaaagca gagaagcaga ggcagaggac aagcgtgggt gacatttgag 4860
 caaagatggg aatgtccag aggcctgcca agatgtgcat gtgcaaaggc cctgagggtc 4920
 aaggggtcct ggatccagag ccaaaagctc aggcctcctc ctctcttcc tctcttct 4980
 cctcttctc ctcttctcc tctccctct cctccctc ccccttctc tctcttccc 5040
 15 cttctctc tctcttcc cctcttct cctccctc ctctctctc tctcttctg 5100
 cctctctc ctctctgc tctctctc gctctctc ctctctcc tgggttactc 5160
 ttccccatta gacaatggca gggaagagag cacacccat catccccagg ccaggcccca 5220
 gccactgact tttaacctt gaaggcattt ttgggtctca cgtgtccacc caggcgggtg 5280
 gccgccttg agcagctctt acttcagaag aacggcatgg agtgggggtt ggggggctta 5340
 20 ggtggcctcc gcctcacctc caactgcca aagtgtgcat ggggtattt ttaacccag 5400
 gggagaggta ttattgtt cacagcagg gcagaggcca gcaggctct cgaactctc 5460
 agaggtgca actgacctca gacacc atg gtgagtgtc agtaaaccct tgagaagaga 5519
 Met
 cgcagggtgg ggagcagaga gataaccccc tccaagcca agcaccctat ggaggagggg 5579
 25 gggaggagga ggggaaggag gagggaagct ctctacgag cccctagcc ctgatggac 5639
 cagcacctg caccctcga gggacccca taagctccc taaggagcca caaatagcag 5699
 ctctcaagg aactgcaaa aatcaatgag aatgctgctt gggggatggg tgcccactac 5759
 ctgatctca gaaatcagta acacccacc cccacccac ccagagctt ccaaacggag 5819
 actgagagct ttaagggc gaattgta tctttcca atcaggtg ccaggaagag 5879
 30 gtttctggt tctctttt gaataitccc ctgaaatat ttgtcccgc ctccagaac 5939
 aggtagcccc cagctgtag agctgcagc taaggggagc agagtgtacg tgtgtgtgc 5999
 tgtgtatct agagaagtga ctcaccctct ctgagcctcc agtctccta gtggagcaga 6059
 ggagagcatt agataatgt ttgaggttt ggggtatcat ttcgctcgc atgtgtctg 6119
 ggtaccagag actcactccc caggtagcag gtctggccc aggtcctgat ccagaggctc 6179
 35 cacagtgtct gatggatatt cctctcag gca cca aag aaa gcc aag aag cgg 6232
 Ala Pro Lys Lys Ala Lys Lys Arg
 5
 ata gaa ggc ggg agc tcc aac tgt ttc tcc atg ttt gag cag acc cag 6280
 40 ile Glu Gly Gly Ser Ser Asn Val Phe Ser Met Phe Glu Gln Thr Gln
 10 15 20 25
 atc cag gag ttc aag gaa 6298
 ile Gln Glu Phe Lys Glu
 30
 45
 <210> 3
 <211> 10475
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> vector compuesto
 <220>
 <221> promotor
 55 <222> (77)..(5517)
 <223> 77-5517 Mus musculus gen de cadena pesada alfa miosina, región promotera (Acc. No. U71441)
 <220>
 <221> CDS
 60 <222> (5558)..(7117)

<223> SEAP
 <220>
 <221> origen_rep
 5 <222> (9750)..(10393)
 <223> pUC origen replic. plásmido
 <220>
 <221> señal_poliA
 10 <222> (9401)..(9406)
 <223> Señal de poliadenilación de timidina-quinasa del virus del herpes simplex
 <220>
 <221> señal_poliA
 15 <222> (9414)..(9419)
 <223> Señal de poliadenilación de timidina-quinasa del virus del herpes simplex
 <220>
 <221> terminador
 20 <222> (9163)..(9165)
 <223> Gen de resistencia a neomicina/kanamicina
 <220>
 <221> ATG
 25 <222> (8371)..(8373)
 <223> Gen de resistencia a neomicina/kanamicina
 <220>
 <221> promotor
 30 <222> (8242)..(8248)
 <223> Promotor inicial SV40
 <220>
 <221> región_repet.
 35 <222> (8167)..(8230)
 <223> Promotor inicial SV40
 <220>
 <221> potenciador
 40 <222> (8018)..(8163)
 <223> Promotor inicial SV40
 <220>
 <221> origen_rep.
 45 <222> (8187)..(8322)
 <223> Origen de replicación SV40
 <220>
 <221> señal_-10
 50 <222> (7931) .. (7936)
 <223> Promotor (b-lactamasa) de resistencia a ampicilina
 <220>
 <221> señal_-35
 55 <222> (7908)..(7913)
 <223> Promotor (b-lactamasa) de resistencia a ampicilina
 <220>
 <221> señal_poliA
 60 <222> (7294) .. (7299)

<223> Señal de poliadenilación de ARNm inicial SV40

<220>
 <221> señal_poliA
 5 <222> (7323)..(7328)
 <223> Señal de poliadenilación de ARNm inicial SV40

<220>
 <221> proteína madura
 10 <222> (5609) .. (7114)
 <223> SEAP

<220>
 <221> codón de inicio
 15 <222> (5558)..(5560)
 <223> ATG del gen de fosfatasa alcalina secretada (SEAP)

<220>
 <221> sig_péptido
 20 <222> (5558)..(5608)
 <223> SEAP
 <400> 3

25 tagttattac tagcgtacc ggactcagat ctcgagctca agcttogaat tctgcagtcg 60
 acggtaccgc gggcccgatc ctgcaagtc acacaagggt ctccaccac caggtgccct 120
 agtctcaat tcagttcca tgcctgttc tcacaatgct ggcctcccca gagctaatt 180
 ggactttgt tttattcaa aagggcctga atgaggagta gatcttgtgc tacccagctc 240
 taagggtgcc cgtgaagccc tcagacctgg agcctttgca acagccctt agtggaagc 300
 agaataaagc aatttccct aaagcaaaa tctgcctct agactctct tctctgacct 360
 30 cgtccctgg gctctaggt gggaggtgg ggcttgaag aagaaggtgg ggaagtgca 420
 aaagccgatc ctagggccc tgtgaagttc ggagcctcc ctgtacagca ctggctcata 480
 gatcctcctc cagccaaaca tagcaagaag tgatactcc tttgtgactt cccagggc 540
 agtacctgtc aggtgaaac aggattaga gaagcctctg aactcacctg aactctgaag 600
 ctatccacc aagcaagcac ctaggtgcca ctgctagta gtatcctacg ctgataat 660
 35 gcagagctgg gccacagaag tctggggtg taggaactga ccagtgactt ttcagtcggc 720
 aaaggtatga cccctcagc agatgtagta atgtcccctt agatccatc ccaggcagg 780
 ctctaagagg acatgggatg agagatgtag tcatgtggca ttccaaacac agctatccac 840
 agtgtccctt gcccttcca ctagccagg aggacagtaa ccttagccta tcttcttcc 900
 tcccctctc ccaggacac acccctgtg ctgcagtatt catttcttc ttcagtcctc 960
 40 ctctgtgact tccatttga agcctttga cctctcagc tcttgaaga tagagtttgg 1020
 ccctaggtgt ggcaagccat ctaagagaa agcagacaac agggggacca gattttgaa 1080
 ggatcaggaa ctaaatcact ggccggcctg ggggtagaaa aaagagttag tagtccgct 1140
 ccagctaagc caagctagc cccagatac tctgccacag ctgggctgct cgggtagct 1200
 ttaggaatgt gggctgaaa gacaatggga ttggaagaca tctctttag tctcccctca 1260
 45 accccacta cagacacact cgtgtgtggc cagactcctg ttcaacagcc ctctgtgttc 1320
 tgacctga gctaggcaac cagagcatgg gccctgtgct gaggatgaag agttggttac 1380
 caatagcaaa aacagcaggg gagggagaac agagaacgaa ataaggaagg aagaaggaaa 1440
 ggccagtcaa tcagatgag tcagaagaga tgggaagcca acacacagct tgagcagagg 1500
 aaacagaaaa gggagagatt ctgggcataa ggaggccaca gaaagaagag cccaggcccc 1560
 50 ccaagtctcc tctttatac ctcctccgt ctccaatta agcccactct tcttctaga 1620
 tcagacctga gctgcagca agagaccgt agggaggatc aactggatg aaggagatgt 1680
 gtggagaagt ccagggaac ctaagagcca gagcctaaaa gagcaagaga taaaggtgct 1740
 tcaaaggtgg ccaggctgtg cacacagagg gtcgaggact ggtgtagag cctcaagata 1800
 aggatgatgc tcagaatggg cggggggggg gattctgggg gggggagaga gaagtgaga 1860
 55 aggagcctgg aacagagaat ctggaagcgc tggaaacgat accataaagg gaagaacca 1920
 ggctacctt agatgtaat catgaaagac agggagaagg gaagctggag agagtagaag 1980
 gacccgggg caagacatgg aagcaaggac aagccagggt gagcgtccg tgaatcagc 2040
 ctgctgaagg cagaccctg gtaggcac cagaacagca gaggctaggg ttaatgtcga 2100
 gacagggaa cagaagtaga cacaggaaca gacagagacg ggggagccag gtaacaaagg 2160
 60 aatggtcct ctcacctgt gccagagcgt ccatctgtgt ccacatact tagaatgttc 2220

atcagactgc agggctggct tgggaggcag ctggaagag tatgtgagag ccaggggaga 2280
 caagggggcc taggaaagga agaagagggc aaaccaggcc acacaagagg gcagagccca 2340
 gaactgagtt aactccttc ttgtgcatc ttccatagga ggcagtggga actctgtgac 2400
 5 caccatcccc catgagcccc cactacccat accaagtttg gctgagtgg cattctaggt 2460
 tccctgagga cagagccttg ctttgtctc ttggacctga cccaagctga cccaatgttc 2520
 tcagtacctt atcatgcctt caagagcttg agaaccaggc agtgacatat taggccatgg 2580
 gctaaccctg gagctgcac acaggagcct caagtacct ccagggacac agctgcagac 2640
 aggtggcctt tatcccaaa gagcaacct ttggcatagg tggctgcaa tgggaatgca 2700
 aggtgtaac aggtcccttc aagaatactg catgcaagac ctaagacccc tggagagagg 2760
 10 ggtatgctcc tgccccacc caccataagg ggagtgaact atcctagggg gctggcgacc 2820
 ttggggagac accacattac tgagagtgt gagccagaa aaactgaccg cctgtgtcc 2880
 tgcccacctc cacactctag agctatatg agagtgaca gtagataggg tgggagctgg 2940
 tagcagggag agtgttctg ggtgtgaggg ttaggggaa agccagagca ggggagtctg 3000
 gcttgtctc ctgaacacaa tgtacttca gttataacag gcatgacctg ctaaagaccc 3060
 15 aacatctag accctgaaa agacagcagc cctggaggac aggggtgtc tctgagcctt 3120
 ggggtcttga tggtgccaca aaggagggca tgagtgtgag tataaggccc caggagcgtt 3180
 agagaagggc acttgggaag gggcagtct gcagagcccc tatccatgga atctggagcc 3240
 tggggccaac tgggtaaaat ctctggcct gccaggcatt caaagcagca cctgcatcct 3300
 ctggcagcct ggggagggcg aaggagcaaa cccccactt atacccttc tcctcagcc 3360
 20 ccaggataa cacctctggc ctccccctt cccacctcc atcaggagtg gagggttga 3420
 gagggaggt aaaaacttac atgtccaaac atcatggtgc acgatatatg gatcagtatg 3480
 ttagagggca agaaagaaa tctgcaggct taactgggtt aatgtgtaa gtctgtgtc 3540
 atgtgtgtg tctgactga aaacgggcat ggctgtgac ctgtcagtt ctgtgcgtga 3600
 ggtaccaga ctgcaggtt gtgtgaaat tgccaaggc aaagtgggtg aatccctcc 3660
 25 atggtttaa gagattgat gatggcctg atctcaagga ccatggaaaa tagaatggac 3720
 acttataatg tctctaaag ctaaggtagc aaggctttg gaggacacct gtctagagat 3780
 gtgggcaaca gagactacag acagtatctg tacagagtaa ggagagagag gagggggtg 3840
 agaattctt tactatcaaa gggaaactga gtcgtgcacc tgcaaagtgg atgtctccc 3900
 tagacatcat gactttgtc ctggggagcc agcactgtg aactcaggt ctgagagagt 3960
 30 aggaggtcc cctcagcctg aagctatgca gatagccagg gttgaaagg ggaagggaga 4020
 gcctgggatg ggagctgtg tttggaggc aggggacaga tattaagcct ggaagagaag 4080
 gtgaccctta cccagttgt caactaccc ttcagattaa aaataactga ggtaagggcc 4140
 tgggtagggg aggtgtgtg agacgtctct gtctctctc tatctgcca tggcccttt 4200
 ggggaggagg aatgtgcca aggactaaaa aaaggccatg gagccagagg ggcgagggca 4260
 35 acagacctt catgggcaaa ccttggggc ctgtgtctt cctgtacct ccagagccaa 4320
 gggatcaaag gaggaggagc caggacagga ggaagtggg agggagggc ccagcagagg 4380
 actccaaat taggcagcag ccatatggga tggatataa aggggctgga gcactgagag 4440
 ctgtcagaga ttctccaac ccaggtaaaga gggagtttc ggtgggggct cttaccac 4500
 accagacctc tccccacta gaaggaact gccttctg gaagtgggt tcaggccgg 4560
 40 cagagatctg acagggtggc cttccaccag cctgggaagt tctagtgcc aggaggttc 4620
 cacaagaaac actggatgcc ccttccctta cgtctctc tccatctcc tctggggat 4680
 gctctccc gtctggitt atctggctc ttgcttca gcaagattg cctgtgtg 4740
 tccactccat cttctctac tctctcctg cttgcttg cttctctg tctctct 4800
 ttccacctt ttctactc acccttctc ccttctcat ttgtattcat ccttctcc 4860
 45 ttcttctt ccttctcc ttcttctt ccttcttc tccctctt ccttctcc 4920
 ttcttctt ccttctcc ttctgtgc agagtgtga gaatcacacc tgggttcc 4980
 accctatgt aaacaactt ccagtggcc acagctcag tctgtctgg tctctctta 5040
 ccttctcac ccctggctt gtctgttc atcctgtca ggtctctag atgtctcc 5100
 cagcctctg tactctct cctgctgt cctctctg tccagctgc cactgtgt 5160
 50 gcctctcc agctgtgtc cacattctc aggattctt gaaaagtta ccaggtgaga 5220
 atgttcccc ttagacagc agatcacgat tctccggaa gtcaggttc cagccctc 5280
 ttctctgc cagctgccc gactcttag caaacctcag gcaccctac cccataga 5340
 cctctgacag agaagcaggc actttacatg gactcctgt gggagagcca taggctcgg 5400
 tgtaaaagag gcagggaagt ggtgtgtg gaaagtcagg acttccata gaagcctagc 5460
 55 ccacaccaga aatgacagac agatccctc tatctcccc ataagattt gagtcgagg 5520
 atctaacag aagcttcaa tgcgaattc gccacc atg ctg ctg ctg ctg 5575

60 Met Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5

ES 2 365 786 T3

ctg ctg ggc ctg agg cta cag ctc tcc ctg ggc atc atc cca gtt gag 5623
 Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu Gly Ile Ile Pro Val Glu
 10 15 20

5 gag gag aac ccg gac ttc tgg aac cgc gag gca gcc gag gcc ctg ggt 5671
 Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly
 25 30 35

10 gcc gcc aag aag ctg cag cct gca cag aca gcc gcc aag aac ctc atc 5719
 Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile
 40 45 50

15 atc ttc ctg ggc gat ggg atg ggg gtg tct acg gtg aca gct gcc agg 5767
 Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg
 55 60 65 70

20 atc cta aaa ggg cag aag aag gac aaa ctg ggg cct gag ata ccc ctg 5815
 Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu
 75 80 85

25 gcc atg gac cgc ttc cca tat gtg gct ctg tcc aag aca tca aat gta 5863
 Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val
 90 95 100

30 gac aaa cat gtg cca gac agt gga gcc aca gcc acg gcc tac ctg tgc 5911
 Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys
 105 110 115

35 ggg gtc aag ggc aac ttc cag acc att ggc ttg agt gca gcc gcc cgc 5959
 Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg
 120 125 130

40 ttt aac cag tgc aac acg aca cgc ggc aac gag gtc atc tcc gtg atg 6007
 Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met
 135 140 145 150

45 aat cgg gcc aag aaa gca ggg aag tca gtg gga gtg gta acc acc aca 6055
 Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr
 155 160 165

50 cga gtg cag cac gcc tcg cca gcc ggc acc tac gcc cac acg gtg aac 6103
 Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn
 170 175 180

55 cgc aac tgg tac tcg gac gcc gac gtg cct gcc tcg gcc cgc cag gag 6151
 Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu
 185 190 195

60 ggg tgc cag gac atc gct acg cag ctc atc tcc aac atg gac att gac 6199
 Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp
 200 205 210

65 gtg atc cta ggt gga ggc cga aag tac atg ttt cgc atg gga ac cca 6247
 Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro
 215 220 225 230

70 gac cct gag tac cca gat gac tac agc caa ggt ggg acc agg ctg gac 6295
 Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp
 235 240 245

ggg aag aat ctg gtg cag gaa tgg ctg gcg aag cgc cag ggt gcc cgg 6343
 Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg
 250 255 260

5 tat gtg tgg aac cgc act gag ctc atg cag gct tcc ctg gac ccg tct 6391
 Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser
 265 270 275

10 gtg acc cat ctc atg ggt ctc ttt gag cct gga gac atg aaa tac gag 6439
 Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu
 280 285 290

15 atc cac cga gac tcc aca ctg gac ccc tcc ctg atg gag atg aca gag 6487
 Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu
 295 300 305 310

20 gct gcc ctg cgc ctg ctg agc agg aac ccc cgc ggc ttc ttc ctc ttc 6535
 Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe
 315 320 325

gtg gag ggt ggt cgc atc gac cat ggt cat cat gaa agc agg gct tac 6583
 Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr
 330 335 340

25 cgg gca ctg act gag acg atc atg ttc gac gac gcc att gag agg cgg 6631
 Arg Ala Leu Thr Gly Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala
 345 350 355

30 ggc cag ctc acc agc gag gag gac acg ctg agc ctc gtc act gcc gac 6679
 Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp
 360 365 370

35 cac tcc cac gtc ttc tcc ttc gga ggc tac ccc ctg cga ggg agc tcc 6727
 His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser
 375 380 385 390

40 atc ttc ggg ctg gcc cct ggc aag gcc cgg gac agg aag gcc tac acg 6775
 Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr
 395 400 405

gtc ctc cta tac gga aac ggt cca ggc tat gtg ctc aag gac ggc gcc 6823
 Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala
 410 415 420

45 cgg ccg gat gtt acc gag agc gag agc ggg agc ccc gag tat cgg cag 6871
 Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln
 425 430 435

50 cag tca gca gtg ccc ctg gac gaa gag acc cac gca ggc gag gac gtg 6919
 Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val
 440 445 450

55 gcg gtg ttc gg cgc ggc ccg cag gcg cac ctg gtt cac ggc gtg cag 6967
 Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu Val His Gly Val Gln
 455 460 465 470

gag cag acc ttc ata cgc cac gtc atg gcc ttc gcc gcc tgc ctg gag 7015
 Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu
 475 480 485

60 ccc tac acc gcc tgc gac ctg gcg ccc ccc gcc ggc acc acc gac gcc 7063

Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala
 490 495 500

5 gcg cac ccg ggt tac tct aga gtc ggg gcg gcc ggc cgc ttc gag cag 7111
 Ala His Pro Gly Tyr Ser Arg Val Gly Ala Ala Gly Arg Phe Glu Gln
 505 510 515
 aca tga taagatacat tgatgagttt ggacgcggcc gcgactctag atcataatca 7167
 Thr

10 gccataccac attgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga 7227
 acctgaaaca taaatgaat gcaattgttg ttgtaactt gtttattgca gcttataatg 7287
 gttacaaata aagcaatagc atcacaatc tcacaaataa agcattttt tcaactgcatt 7347
 ctagtgtggg ttgtccaaa ctatcaatg tatcttaagg cgtaaattgt aagcgtaat 7407
 atttgttaa aattcgcgtt aaattttgt taaatcagct catttttaa ccaataggcc 7467

15 gaaatcggca aatccccta taaatcaaaa gaatagaccg agataggggt gagtggtgt 7527
 ccagtttgga acaagagtcct actataaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa 7587
 accgtctatc agggcgatgg cccactactg gaaccatcac cctaatacaag tttttgggg 7647
 tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gccccgatt tagagctga 7707
 cggggaaagc cggcgaaact ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg agcgggagct 7767

20 agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc cgcgctaat 7827
 gcgcccctac agggcgctc aggtggcact ttccgggaa atgtgcgagg aaccctatt 7887
 tgtttattt tctaaataca tcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa 7947
 atgctcaat aatattgaaa aaggaagagt cctgaggcgg aaagaaccag ctgtggaatg 8007
 tgtgtcagtt aggggtgga aagccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 8067

25 tgcatctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggtccccca gcaggcagaa 8127
 gtagcaaaag catgcatctc aatagtcag caaccatagt cccgccccta actccgccc 8187
 tcccggccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaattttt 8247
 ttatttatgc agaggccgag gccgctcgg cctctgagct attccagaag tagtgaggag 8307
 gctttttgg aggcctaggc ttttgaaaag atcgatcaag agacaggatg aggatcgttt 8367

30 ccatgattg aacaagatgg atgacagca ggttctccgg ccgctgggt ggagaggcta 8427
 ttccgctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgctg gttccggctg 8487
 tcagcgcagg ggcgcccgt tctttttgc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa 8547
 ctgcaagacg aggcagcgcg gctatctgtg ctggccacga cggcggtcc ttgcgcagct 8607
 gtgctcagc ttgtactga agcgggaagg gactggctgc tattggcga agtgccgggg 8667

35 caggatctcc tgcatctca cctgtcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca 8727
 atgcggcggc tgcatcctg tcatcggct acctgcccac tcgaccacca agcgaacat 8787
 cgcacgcagc gacacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac 8847
 gaagagcadc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gagcatgcc 8907
 gacggcgagg atctcgtctg gaccatggc gatgctctg tgccgaatat catggtggaa 8967

40 aatggcgcct ttcttgatt catgactgt ggccggctgg gtgtggcga ccgctatcag 9027
 gacatagcgt tggctaccgc tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc 9087
 ttctctgtc ttacggatc gcgcctccc gattcgcagc gcacgcctt ctatgcctt 9147
 ctgacgagt tctctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgacca gcgacgccc 9207
 acctgccatc acgagattc gattccaccg ccgcttcta tgaaagggtg ggctcggaa 9267

45 tcgtttccg ggacgcccgc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct 9327
 tcgcccacc tagggggagg ctaactgaaa cacggaagga gacaataccg gaaggaacc 9387
 gcgctatgac ggcaataaaa agacagaata aaacgcacgg tgttggtcgc tttgtcata 9447
 aacgcggggt tcggtcccag ggctggcact ctgtcgatc cccaccgaga cccattggg 9507
 gccaatagc ccgctttct tcttttccc caccaccacc ccaagtctg ggtgaaggcc 9567

50 cagggctcgc agccaacgtc gggggcgcag gccctgcat agcctcagg tactcatata 9627
 tactttagat tgatttaaaa ctctatttt aaittaaaag gatctagggt aagatccttt 9687
 ttgataatt catgacaaa atcccctaac gtgagtttc gttccactga gcgtcagacc 9747
 ccgtagaaaa gatcaaaagg tctcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct 9807
 tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggttgttt gccgatcaa gagctacaa 9867

55 ctcttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgagat accaaatac gtctcttag 9927
 ttagaccgta gtagccac cactcaaga actctgtagc accgccaca tacctcgtc 9987
 tgtaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgctt accgggttg 10047
 actcaagacg atagtaccg gataagcgc agcggctcgg ctgaacgggg ggttcgtgca 10107
 cacagcccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 10167

60 gagaaagcgc cagcttccc gaaggagaa aggggacag gtatccgga agcggcaggg 10227

tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc caggggaaa cgcttggtat cttatagtc 10287
ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgatttt gtgatgctcg tcaggggggc 10347
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc tttgctggc 10407
ctttgctca catgttctt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 10467
5 ccatgcat 10475

<210> 4
<211> 519
<212> PRT
10 <213> SEAP

<400> 4

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
15 1 5 10 15
Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu
20 20 25 30
Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr
35 40 45
20 Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
50 55 60
Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
65 70 75 80
Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu
25 85 90 95
Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr
100 105 110

Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly
30 115 120 125
Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn
130 135 140
Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val
145 150 155 160
35 Gly Val Val Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr
165 170 175
Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro
180 185 190
Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile
40 195 200 205
Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met
210 215 220
Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln
225 230 235 240
45 Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala
245 250 255
Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln
260 265 270
Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro
50 275 280 285
Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser
290 295 300

Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Aer Arg Asn Pro
55 305 310 315 320
Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His
325 330 335
His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp
340 345 350
60 Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu

	355	360	365	
	Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr			
	370	375	380	
5	Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg			
	385	390	395	400
	Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr			
	405	410	415	
	Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly			
10	420	425	430	
	Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr			
	435	440	445	
	His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His			
	450	455	460	
15	Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala			
	465	470	475	480
	Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro			
	485	490	495	
	Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Tyr Ser Arg Val Gly Ala			
20	500	505	510	
	Ala Gly Arg Phe Glu Gln Thr			
			515	

REIVINDICACIONES

1. Un método para hacer el seguimiento de la diferenciación celular que comprende:
- 5 cultivo de células capaces de diferenciarse en, al menos, un tipo celular específico que contiene, al menos, una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un gen informador que codifica un producto que se secreta tras la diferenciación celular, o mantener un animal no humano que comprende dichas células bajo condiciones que permiten la diferenciación de las células; y
- 10 cuantificar las células diferenciadas determinando la cantidad o actividad del producto génico informador en un fluido corporal de dicho animal no humano transgénico o en el medio de cultivo celular.
2. El método de la reivindicación 1 en donde dicha molécula de ácido nucleico recombinante comprende, al menos, una secuencia reguladora con especificidad para el tipo celular unida de modo operable a dicho gen informador.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 ó 2 en donde dichas células son, o se derivan de, células madre.
4. El método de la reivindicación 3 en donde dichas células madre son células de una línea de células madre embrionarias o células progenitoras adultas multipotentes (MAPC).
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde dicho producto génico informador comprende una secuencia secretora candidata a fármaco.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 en donde dicha secuencia reguladora comprende un elemento promotor y/o potenciador.
- 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en donde dicho tipo celular se selecciona del grupo que consiste en fibroblastos del tejido conectivo, células estromales, células endoteliales, células gliales, células neurales, células neuronales, células hematopoyéticas, células de músculo liso, células de músculo esquelético, células epiteliales y células cardíacas.
- 30 8. El método de la reivindicación 6 ó 7 en donde dicho promotor o potenciador se selecciona del grupo que consiste en promotor o potenciador α MHC, MLC2V, VE-cadherina, Tie-2, Fik-1, Fit-1, GFAP, tubulina alfa-1 y colágeno 2.
- 35 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en donde dicho producto génico informador es fosfatasa alcalina secretada (SEAP) o alfa-amilasa.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde dicha molécula de ácido nucleico recombinante comprende un marcador que puede seleccionarse expresado mediante células multipotentes o pluripotentes.
- 40 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en donde dichas células forman agregados celulares o agregados de tipo tisular derivados de tipos celulares diferentes.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en donde dichas células forman cuerpos embrioides (EB).
- 45 13. Un constructo génico informador para hacer el seguimiento de la diferenciación celular cuantificando las células diferenciadas que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6 ó 8-10.
- 50 14. Una célula que comprende un constructo génico informador de la reivindicación 13 en donde dicha célula es capaz de diferenciarse en, al menos, un tipo celular concreto.
15. Un agregado celular de, al menos, un tipo celular que comprende células de la reivindicación 14.
- 55 16. Un tejido que comprende células de la reivindicación 14 o un agregado celular de la reivindicación 15.
17. Un órgano que comprende un tejido de la reivindicación 16, una célula de la reivindicación 14 o un agregado celular de la reivindicación 15.
- 60 18. Un implante o trasplante que comprende un órgano de la reivindicación 17, un tejido de la reivindicación 16, una célula de la reivindicación 14 o un agregado celular de la reivindicación 15.

- 5 19. Un animal no humano que comprende un constructo génico informador de la reivindicación 13, una célula de la reivindicación 14, un agregado celular de la reivindicación 15, un tejido de la reivindicación 16 o un órgano de la reivindicación 17.
20. Una composición de materia que comprende un constructo génico informador de la reivindicación 13, un tejido de la reivindicación 16, células de la reivindicación 14 o un agregado celular de la reivindicación 15.
- 10 21. Un array que comprende un soporte sólido y, unido al mismo, o suspendido sobre el mismo, células de la reivindicación 14, un agregado celular de la reivindicación 15 o un tejido de la reivindicación 16.
22. Uso de un aparato para analizar el array de la reivindicación 21.
- 15 23. Un método de obtención y/o perfilado de un modulador de la diferenciación celular que comprende:
poner en contacto una muestra de análisis que comprende una célula de la reivindicación 14, un agregado celular de la reivindicación 15, un tejido de la reivindicación 16 o un órgano de la reivindicación 17 o un animal no humano de la reivindicación 19 con una sustancia de análisis; y
determinar el efecto de la sustancia de análisis en la cantidad del producto génico informador o actividad en comparación con una muestra o animal de control.
- 20 24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 ó 23 en donde se añade al medio de cultivo o al animal un compuesto que se sabe que activa o inhibe el proceso de diferenciación.
- 25 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24 en donde la sustancia de análisis es un agente terapéutico o una mezcla de agentes terapéuticos.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 23-25 que se realiza en un array.
- 30 27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 ó 23-26 en donde dicha una o más células se manipulan genéticamente para (sobre)expresar o inhibir la expresión de un gen diana.
- 35 28. Un kit útil para llevar a cabo un método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 ó 23-27 que contiene un constructo génico informador de la reivindicación 13 o una célula de la reivindicación 14 y, opcionalmente, compuestos estándar, como medios de cultivo, agentes de selección, agentes de detección para la molécula informadora y muestras de control.
- 40 29. Uso de un constructo génico informador de la reivindicación 13, una célula de la reivindicación 14, un agregado celular de la reivindicación 15, un tejido de la reivindicación 16, un órgano de la reivindicación 17, el implante o trasplante de la reivindicación 18, un animal no humano de la reivindicación 19, la composición de la reivindicación 20 o un array de la reivindicación 21 en el descubrimiento de medicamentos o en el perfilado farmacocinético o farmacológico.
- 45 30. Un vector que comprende la región promotora del gen de cadena pesada de alfa-miosina de ratón o del gen de cadena ligera del regulador de miosina ventricular y unida de modo operable a la misma una secuencia de ADN heteróloga que codifica la proteína fosfatasa alcalina secretada (SEAP).
- 50 31. El vector de la reivindicación 30 en donde dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 1 ó 2, o un fragmento de la misma.
32. El vector de la reivindicación 30 ó 31 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 3.
- 55 33. Uso de una región promotora del gen de cadena pesada de alfa-miosina de ratón o del gen regulador de la cadena ligera de miosina ventricular para la expresión específica de secuencias de ADN heterólogas durante la embriogénesis o desarrollo celular en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 ó 23-27.

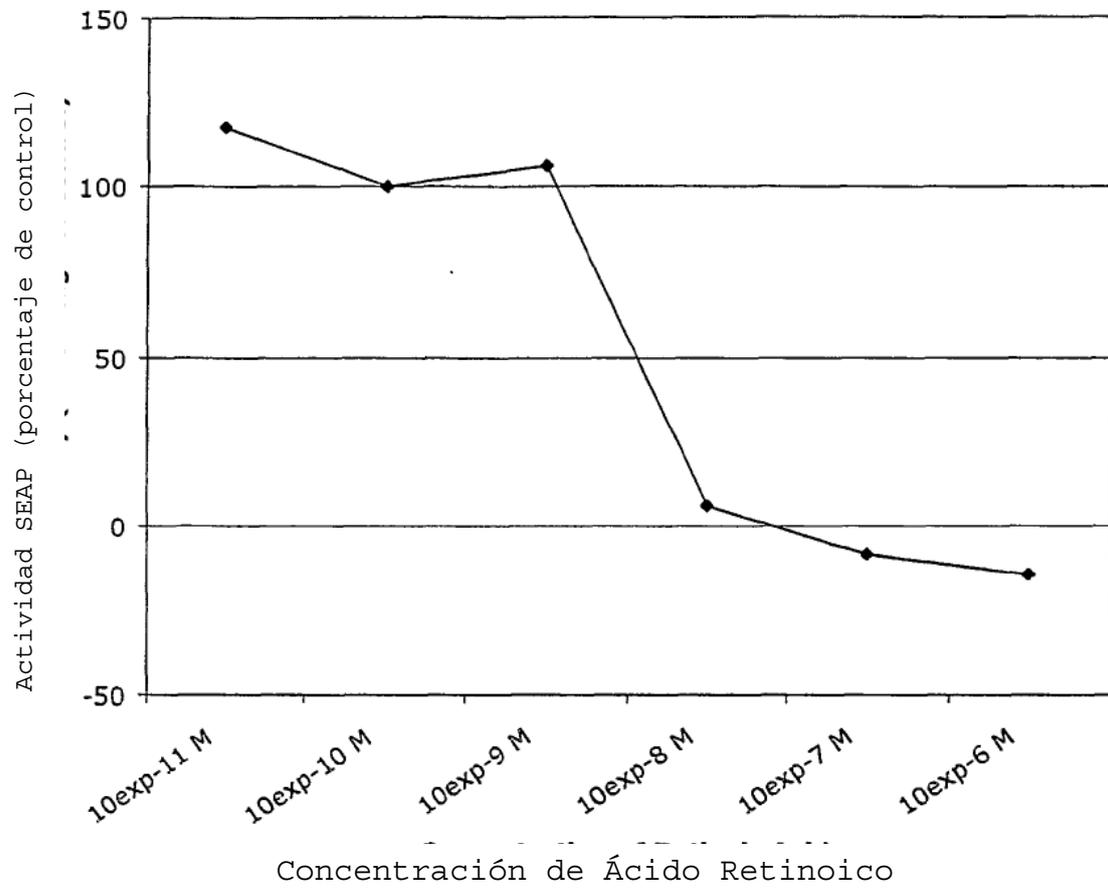


Fig. 1