

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 954**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2005 E 10010425 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2270196**

54 Título: **Ensayo para el descubrimiento de fármacos basado en células diferenciadas in vitro**

30 Prioridad:

11.05.2004 EP 04011214

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

17.08.2016

73 Titular/es:

**AXIOGENESIS AG (100.0%)
Nattermannallee 1, Gebäude S20
50829 Köln, DE**

72 Inventor/es:

**BOHLEN, HERIBERT;
TRESSAT, KRISTINA, DR.;
EHLICH, ANDREAS y
SCHWENGBERG, SILKE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 579 954 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

Ensayo para el descubrimiento de fármacos basado en células diferenciadas *in vitro*

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención no se refiere a la utilización de células derivadas de un embrión humano.

[0002] La presente invención se refiere al campo técnico de los ensayos celulares para identificar y/o obtener un fármaco para la mejora o tratamiento de una enfermedad o para determinar la toxicidad de un compuesto determinado. En concreto, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar y/o obtener un fármaco para la mejora o tratamiento de una enfermedad o para determinar la toxicidad de un compuesto que comprende poner en contacto una muestra de ensayo que comprende una célula diferenciada *in vitro* con una sustancia de ensayo que se va a cribar, en el que se induce la expresión en dicha célula de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula, tejido u órgano enfermos; y determinar un cambio sensible del fenotipo en dicha muestra de ensayo, en el que un cambio sensible que evite o retrase el inicio o la progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de un fármaco útil y si potencia el inicio o progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de la toxicidad del compuesto. El procedimiento de la presente invención se usa, preferiblemente, con embriocitos indiferenciados y, en general, se puede aplicar para la identificación de efectos protectores de cualquier compuesto terapéutico prometedor y también para determinar potenciales efectos secundarios que pueda tener un compuesto determinado para un sujeto que padezca una enfermedad concreta. El ensayo de la presente invención es especialmente adecuado para cribar la capacidad de una sustancia de mejorar una cardiomiopatía. Además, la presente invención se refiere a kits y a un equipo para realizar el ensayo celular de la invención y para analizar los resultados así obtenidos.

25

Antecedentes de la invención

[0003] La cardiopatía es uno de los problemas de salud más graves del mundo occidental. Se estima que 61 millones de americanos (casi 1 de cada 5 hombres y mujeres) tienen uno o más tipos de enfermedad cardiovascular (National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-1994, Center of Disease Control and the American Heart Association). Afecciones extendidas incluyen la enfermedad coronaria cardiaca (12,4 millones), defectos cardiovasculares congénitos (1 millón) e insuficiencia cardiaca congestiva (4,7 millones). Un reto primordial en investigación en medicina regenerativa es identificar y desarrollar fármacos que puedan ayudar a reconstituir la función cardiaca en estas afecciones.

35

[0004] El desarrollo de nuevos fármacos es obstaculizado por la falta de sistemas celulares *in vitro* adecuados que se asemejen a tejido enfermo, por ejemplo, células cardiacas miopáticas. Diversos intentos de obtener miocitos cardiacos inmortalizados se describen en los documentos Sen y col., J. Biol. Chem. 263 (1988), 19132-19136; Gartside y Hauschka en "The Development and Regenerative Potential of Cardiac Muscle", eds. Oberpriller y col., Harwood, New York, 1991, 7941-7948; Jaffredo y col., Exp. Cell. Res. 192 (1991), 481-491; Wang y col., In Vitro Cell Dev. Biol. 27 (1991), 63-74; Katz y col., Am. J. Physiol. 262 (1992), 1867-1876; Engelmann y col., J. Mol. Cell Cardiol. 25 (1993), 197-213; Borisov y Claycomb, Ann. NY Acad. Sci. 752 (1995), 80-91; Jahn y col., J. Cell Sci. 109 (1996), 397-407. Sin embargo, el fenotipo cardiaco de las células así obtenidas bien no es estable o bien las células pierden su capacidad de proliferar. Además, se ha descrito una línea celular de cardiomiocitos auriculares inmortalizados murinos que mantiene características de diferenciación y capacidad de proliferación durante un periodo de tiempo mayor (Claycomb y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 95 (1998), 2979-2984).

[0005] A menudo se usan preparaciones de células cardiacas aisladas de ratón o rata como un sistema modelo de cardiopatía *in vitro* basado en cardiomiocitos no transformados; véase el documento Chlopikova y col., Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 145 (2001), 49-55. Estas células mantienen su fenotipo diferenciado sólo durante unos días. Además, estos cultivos primarios no son homogéneos sino que contienen diferentes tipos de células y varían para cada preparación. Un problema concreto consiste en la contaminación de los cardiomiocitos por otros tipos de células presentes en el corazón, en concreto fibroblastos, los cuales, al contrario que los cardiomiocitos que no están en división, proliferan en gran medida y no se pueden eliminar completamente del cultivo. Algunos receptores expresados por los cardiomiocitos, así como por células diferentes a los cardiomiocitos y los cardiomiocitos, segregan moléculas que interactúan con receptores de células diferentes a los cardiomiocitos, así como viceversa, células diferentes a los cardiomiocitos segregan moléculas que se unen a receptores de cardiomiocitos.

[0006] Por consiguiente, en vista de la preparación bastante laboriosa de células de tejido u órganos, que podrían servir como sistema modelo para un fenotipo de enfermedad *in vitro*, todavía se usan modelos de animales transgénicos tales como el modelo de animal transgénico de insuficiencia cardiaca descrito en la solicitud internacional WO97/36477 o para una cardiopatía humana descrito en la solicitud de patente alemana No. 19815128. Recientemente, se ha descrito un modelo de animal transgénico para producir hipertrofia cardiaca en

60

ratones transgénicos en la patente estadounidense nº 6.657.104.

[0007] Sin embargo, estos procedimientos de ensayo tienen la desventaja de que requieren el uso de un gran número de mamíferos vivos, en concreto ratas y ratones, y, obviamente, no conducen a un cribado de elevada productividad.

[0008] Por tanto, hay necesidad de sistemas de ensayo celular *in vitro* que se puedan llevar a cabo fácilmente y proporcionen resultados fiables. La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y descritas adicionalmente a continuación.

Descripción resumida de la invención

[0009] La presente invención no se refiere a la utilización de células derivadas de un embrión humano.

[00010] La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar y/o obtener un fármaco para la mejora o tratamiento de una enfermedad o para determinar la toxicidad de un compuesto que comprende poner en contacto una muestra de ensayo que comprende una célula diferenciada *in vitro* con una sustancia de ensayo que se va a cribar, en el que en dicha célula se induce la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula, tejido u órgano enfermos; y determinar un cambio sensible del fenotipo en dicha muestra de ensayo, en el que un cambio sensible que evite o retrase el inicio o la progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de un fármaco útil y si potencia el inicio o progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de la toxicidad del compuesto.

[00011] Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para cribar una sustancia respecto a la capacidad de mejorar una cardiomiopatía que comprende poner en contacto una muestra de ensayo que comprende un cardiomiocito diferenciado *in vitro* con una sustancia de ensayo antes, durante o después de que en dicha célula se induzca la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula, tejido u órgano enfermos; medir un parámetro cardiomiopático en el cardiomiocito; y comparar la medición así obtenida con la de un cardiomiocito no sometido a la sustancia; en el que la medición del parámetro del cardiomiocito en los cardiomiocitos es coherente con una reducción en la hipertrofia cardíaca.

[00012] La presente invención también se refiere a un kit o composición útiles para realizar el ensayo basado en células diferenciadas *in vitro* de la presente invención, que contiene una célula multi o pluripotente, una célula diferenciada *in vitro*, un agente fisiológicamente activo y, opcionalmente, medio de cultivo, moléculas de ácido nucleico recombinante y/o compuestos patrón.

[00013] Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de identificación y/o obtención de un gen o producto génico implicado en una enfermedad como la diana de un fármaco, que comprende obtener el perfil de la expresión de una célula diferenciada *in vitro* antes y después de la inducción de un fenotipo de enfermedad, en el que la expresión diferencial de un gen o producto génico es indicativa de una potencial diana del fármaco y, opcionalmente, que comprende clonar el gen identificado o un correspondiente ADNc o fragmento del mismo.

[00014] Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de validación de una potencial diana del fármaco que comprende modificar la expresión de un gen diana y/o actividad del producto génico diana en una célula diferenciada *in vitro* antes, durante o después de que en dicha célula se induzca la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula, tejido u órgano enfermos; y determinar un cambio sensible del fenotipo de dicha célula, en el que un cambio sensible que evite o retrase el inicio o la progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de la activación de la diana del fármaco y si potencia el inicio o progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de la inhibición de la diana del fármaco para el tratamiento de la enfermedad.

[00015] Según otro aspecto, la invención se refiere al uso de una célula diferenciada *in vitro* en la que se induce la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido en la validación de la diana, descubrimiento del fármaco o la obtención del perfil farmacocinético o farmacológico.

[00016] En otra realización adicional de la invención se proporciona un procedimiento de realización de la comercialización del descubrimiento de una diana que comprende proporcionar un ensayo celular de la invención; y/o realizar la obtención del perfil de la toxicidad y/o terapéutico de un compuesto en tal ensayo; y conceder, a una tercera parte, los derechos para el desarrollo adicional de un fármaco y/o la venta de un fármaco identificado en un ensayo de la presente invención y/o proporcionar la información sobre el perfil así obtenido.

[00017] Otras realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la descripción que se expone a continuación.

Breve descripción de los dibujos

[00018]

Figura 1. Los cardiomiocitos derivados de células ES aumentan de tamaño tras la estimulación con endotelina-1 y fenilefrina. Los cardiomiocitos que expresan la GFP se cultivaron en fibroblastos de ratón embrionarios inactivos y se privaron de suero durante 24 h. A continuación, los cultivos se estimularon durante 24 h con fenilefrina (A; 100 µM) o endotelina-1 (B; 100 nM). C; células no tratadas.

Figura 2. Organización de los sarcómeros de cardiomiocitos derivados de células ES tras estimulación con endotelina-1 y fenilefrina. Los cardiomiocitos se cultivaron en fibroblastos de ratón embrionarios inactivos y se privaron de suero durante 24 h. A continuación, los cultivos se estimularon durante 24 h con fenilefrina (A; 200 µM) o endotelina-1 (B; 100 nM). C; células no tratadas. Inmunotinción de alfa-actinina sarcomérica.

Figura 3. Inducción de la expresión del ANF y del BNP en cardiomiocitos derivados de células ES. Los cardiomiocitos diferenciados a partir de células ES se privaron de suero durante 24 h y, a continuación, se estimularon con endotelina-1 (100 nM; bandas 1, 6, 11), fenilefrina (200 µM; bandas 2, 7, 11) o angiotensina II (100 nM; bandas 3, 8, 13). Se cultivaron muestras de control no estimuladas en un medio sin suero (bandas 4, 9, 14) o en un medio suplementado con suero (bandas 5, 10, 15). A continuación, se extrajo el ARN y se sintetizó ADNc usando cebado con hexámeros al azar. Se amplificó el ADNc del ANF, el BNP y la gapdh y los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. M, marcador de tamaño. Los parámetros de amplificación fueron los siguientes. El ADNc se amplificó con 32 (ANF y BNP) o 26 (gapdh) ciclos de PCR, consistiendo cada uno en 1 min a 94°C, 1 min a 56°C y 1 min a 72°C. Se usaron los cebadores siguientes: ANF-5', 5'-CTCCTTCTCCATCACCCTG-3' (SEQ ID NO: 14); ANF-3', 5'-TTTCCTCCTTGGCTGTTATC-3' (SEQ ID NO: 15); BNP-5', 5'-CAGCTCTTGAAGGACCAAGG-3' (SEQ ID NO: 18); BNP-3', 5'-AGACCCAGGCAGATCAGAA-3' (SEQ ID NO: 19); gapdh-5', 5'-GTGTTCTACCCCAATGTG-3' (SEQ ID NO: 16); gapdh-3' 5'-CTTGCTCAGTGTCCCTTGCTG-3' (SEQ ID NO: 17). El tamaño esperado de los productos de la PCR era de 468 pb (ANF), 242 pb (BNP) y 349 pb (gapdh).

Figura 4. La expresión de calcineurina constitutivamente activa conduce a mayores niveles de ARNm del ANF en cardiomiocitos derivados de células ES.

Bandas 1, clon PIG (control), sin privación de suero.

Bandas 2, clon PIG (control), privación de suero.

Bandas 3, MHC-Calci*-PIG, sin privación de suero. Bandas 4, MHC-Calci*-PIG, privación de suero.

Bandas 5, sin ADNc.

Izquierda, detección de ARNm del ANF; derecha, detección de ARNm de la gapdh.

Definiciones

[00019] Para los propósitos de la presente descripción, el término "citoblasto" se puede referir bien a un citoblasto o bien a una célula germinal, por ejemplo, embriocito indiferenciado (célula ES) y célula germinal (célula EG), siempre que la célula no sea una célula ES humana o un derivado de la misma o una célula EG humana o un derivado de la misma, respectivamente, pero incluyendo también células precursoras histoespecíficas. Como mínimo, un citoblasto tiene la capacidad de proliferar y formar células de más de un fenotipo diferente y también es capaz de reproducirse – bien como parte del mismo cultivo o bien cuando se cultiva en condiciones diferentes. Los embriocitos indiferenciados también son típicamente telomerasa positivos y OCT-4 positivos. La actividad de la telomerasa se puede determinar usando el ensayo de actividad TRAP (Kim y col., Science 266 (1997), 2011), usando un kit disponibles en el mercado (TRAPeze(R) XK Telomerase Detection Kit, Cat. s7707; Intergen Co., Purchase N.Y.; o TeloTAGGG(TM) Telomerase PCR ELISAplus, Cat. 2.013.89; Roche Diagnostics, Indianápolis). También se puede evaluar la expresión de la hTERT a nivel del ARNm mediante RT-PCR. El kit de cuantificación de hTERT LightCycler TeloTAGGG(TM) (Cat. 3.012.344; Roche Diagnostics) está disponible en el mercado con fines de investigación.

[00020] Según la presente invención, siempre que la célula no sea un embriocito indiferenciado humano o un derivado del mismo, la expresión embriocito indiferenciado (célula ES) incluye cualquier citoblasto multi o pluripotente derivado de tejido preembrionario, embrionario o fetal en cualquier momento tras la fecundación y tiene la característica de ser capaz, en las condiciones adecuadas, de producir descendencia de varios tipos diferentes de células que son derivadas de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), según un ensayo estándar aceptado en la técnica, tal como la capacidad de formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de edad.

[00021] "Células germinales embrionarias" o "células EG" son células derivadas de células germinales primordiales. La expresión "célula germinal embrionaria" se usa para describir células de la presente invención que exhiben un fenotipo celular embrionario pluripotente. La expresión "célula germinal embrionaria" se usa en el presente documento para describir células de mamíferos, pero no humanas, o líneas celulares de las mismas, de la presente invención, que exhiben un fenotipo de embriocitos indiferenciados pluripotentes tal como se define en el presente documento. Por tanto, las células EG son capaces de diferenciarse en células de las capas germinales ectodérmica, endodérmica y mesodérmica. Las células EG también se pueden caracterizar por la presencia o ausencia de marcadores asociados con sitios de epítomos específicos identificados por la unión de anticuerpos concretos y por la ausencia de determinados marcadores identificados por la falta de unión de determinados anticuerpos.

[00022] “Pluripotente(s)” se refiere a células que mantienen el potencial de desarrollo de diferenciación en una amplia gama de estirpes celulares incluyendo la línea germinal. Las expresiones “fenotipo de embriocito(s) indiferenciado(s)” y “célula tipo embriocito indiferenciado” se pueden usar indistintamente en el presente documento para describir células que no están diferenciadas y, por tanto, son pluripotentes y que, preferiblemente, son capaces de distinguirse visualmente de otras células adultas del mismo animal.

[00023] En la definición de células ES se incluyen células embrionarias de diversos tipos, ejemplificadas por embriocitos indiferenciados de primates, tales como citoblastos de macaco Rhesus (Thomson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 92 (1995), 7844) y citoblastos de mono tití (Thomson y col., Biol. Reprod. 55 (1996), 254). También están incluidas en la expresión otros tipos de células pluripotentes. Está incluida cualquier célula de origen mamífero que sea capaz de producir descendencia que sea derivada de las tres capas germinales, independientemente de si proceden de tejido embrionario, tejido fetal u otra fuente, siempre que las células no deriven de un embrión humano. Los citoblastos usados según la presente invención son, preferiblemente (pero no siempre necesariamente) de cariotipo normal. Sin embargo, es preferible no usar células ES que procedan de una fuente tumoral.

[00024] “Células sustrato” o “sustratos” son expresiones usadas para describir células de un tipo que se cultivan conjuntamente con células de otro tipo, para proporcionar un entorno en el que puedan crecer las células del segundo tipo. Las células sustrato son, opcionalmente, de una especie diferente a la de las células a las que sirven de soporte. Por ejemplo, determinados tipos de células ES pueden usar como soporte fibroblastos embrionarios de ratón primarios, fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (tales como células STO murinas, p. ej., Martin y Evans, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 72 (1975), 1441-1445). La expresión “célula STO” se refiere a células de ratón fibroblásticas embrionarias tales como las disponibles en el mercado e incluyen las depositadas como CRL 1503 de la ATCC.

[00025] La expresión “cuerpos embrioides” (EB) es una expresión de la técnica sinónimo de “cuerpos de agregados”. Las expresiones se refieren a agregados de células diferenciadas y no diferenciadas que aparecen cuando las células ES crecen en exceso en cultivos monocapa o se mantienen en cultivos en suspensión. Los cuerpos embrioides son una mezcla de diferentes tipos de células, típicamente de varias capas germinales, que se pueden distinguir mediante criterios morfológicos; véase también posteriormente. Tal como se usan en el presente documento, “cuerpo embriode”, “EB” o “células EB” típicamente se refieren a estructuras morfológicas constituidas por una población de células, la mayoría de las cuales proceden de embriocitos indiferenciados (células ES) que se han diferenciado. En condiciones de cultivo adecuadas para la formación de EB (p. ej., la eliminación del factor inhibidor de la leucemia u otros factores bloqueantes similares), las células ES proliferan y forman pequeñas masas de células que comienzan a diferenciarse. En la primera fase de la diferenciación, generalmente correspondiente a aproximadamente los días 1-4 de la diferenciación en seres humanos, la pequeña masa de células forma una capa de células endodérmicas en la capa externa y se considera un “cuerpo embriode simple”. En la segunda fase, generalmente correspondiente a aproximadamente los días 3-20 de la post-diferenciación en seres humanos, se forman “cuerpos embrioides complejos”, que se caracterizan por una diferenciación extensa de células ectodérmicas y mesodérmicas y tejidos derivados. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “cuerpo embriode” o “EB” abarca cuerpos embrioides tanto simples como complejos, a menos que sea necesario lo contrario según el contexto. La determinación de cuándo se han formado los cuerpos embrioides en un cultivo de células ES rutinariamente es realizada por personas expertas en la materia, por ejemplo, mediante inspección visual de la morfología. Se considera que masas flotantes de aproximadamente 20 células o más son cuerpos embrioides; véase, p. ej., Schmitt y col., Genes Dev. 5 (1991), 728-740; Doetschman y col., J. Embryol. Exp. Morph. 87 (1985), 27-45. También se sobrentiende que las expresiones “cuerpo embriode”, “EB” o “células EB”, tal como se usan en el presente documento, abarcan una población de células, la mayoría de las cuales son células pluripotentes capaces de desarrollar diferentes estirpes celulares cuando se cultivan en las condiciones adecuadas. Tal como se usan en el presente documento, las expresiones también se refieren a estructuras equivalentes derivadas de células germinales primordiales, que son células primitivas extraídas de regiones gonadales embrionarias; véase, p. ej., Shambloott, y col. (1998), anteriormente. Las células germinales primordiales, a veces denominadas también en la técnica células EG o células germinales embrionarias, cuando se tratan con los factores adecuados forman células ES pluripotentes a partir de las cuales pueden derivar cuerpos embrioides; véase, p. ej., la patente estadounidense nº 5.670.372; Shambloott y col., anteriormente.

[00026] Las expresiones “polinucleótido” y “molécula de ácido nucleico” se refieren a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud. Están incluidos genes y fragmentos de genes, ARNm, ARNt, ARNr, ribocimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN y ARN aislados, sondas de ácido nucleico y cebadores. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término polinucleótidos se refiere de forma indistinta a moléculas bi y monocatenarias. A menos que se especifique o se requiera lo contrario, cualquier realización de la invención que es un polinucleótido abarca tanto una forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se sabe o prevé que constituyen la forma bicatenaria. Están incluidos análogos de ácidos nucleicos tales como fosporamidatos y tiofosporamidatos.

[00027] Se dice que una célula está “genéticamente modificada”, “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 descendencia de la célula originalmente modificada que ha heredado el polinucleótido. El polinucleótido a menudo comprenderá una secuencia transcribible que codifica una proteína de interés, lo que posibilita que la célula exprese la proteína a un nivel elevado. La modificación genética se dice que es “heredable” si la descendencia de la célula modificada tiene la misma modificación.

[00028] Una “secuencia reguladora” o “secuencia de control” es una secuencia nucleotídica implicada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, tal como replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, poliadenilación, traducción o degradación del polinucleótido. Los elementos de control transcripcional incluyen promotores, potenciadores y represores.

[00029] Las secuencias de genes concretas denominadas promotores, como el promotor del “ α MHC” o del “colágeno”, son secuencias polinucleotídicas derivadas del gen relacionado, que favorecen la transcripción de un producto de expresión génica operativamente relacionado. Se admite que diversas porciones de la secuencia génica no traducida del intrón en dirección 5' pueden, en algunos casos, contribuir a la actividad del promotor y que todos o cualquiera de los subconjuntos de estas porciones pueden estar presentes en la construcción modificada por ingeniería genética relacionado. El promotor puede estar basado en la secuencia génica de cualquier especie que tenga el gen, a menos que exista una restricción explícita, y puede incorporar cualquier adición, sustitución o delección deseable, siempre y cuando mantenga la capacidad de promover la transcripción en el tejido diana. Las construcciones genéticas diseñadas para el tratamiento de humanos típicamente comprenden un segmento que es al menos idéntico en el 90% a la secuencia de un promotor de un gen humano.

[00030] Según la presente invención, la expresión “promotor dependiente de la célula y/o el desarrollo” pretende significar un promotor que muestra su actividad de promotor sólo en tipos de células concretas y/o sólo en etapas concretas del desarrollo celular, tanto en cultivos celulares (cuerpos embrioides) como en mamíferos transgénicos no humanos derivados de células ES según la invención. Además, se puede usar cualquier otro promotor específico para un tipo de célula conocido, p. ej., para células del tejido nervioso, células del tejido cardíaco, neuroglíocitos, células hematopoyéticas, células endoteliales, células del músculo liso, células del músculo esquelético, células cartilaginosas, fibroblastos y células epiteliales.

[00031] Se dice que los elementos genéticos están “operativamente relacionados” si tienen una relación estructural que permite que funcionen de modo acorde a su función prevista. Por ejemplo, si un promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante, se puede decir que la secuencia codificante está operativamente relacionada con (o bajo el control de) el promotor. Puede haber una secuencia intercalada entre el promotor y la región codificante mientras se mantenga esta relación funcional.

[00032] En el contexto de las secuencias codificantes, promotores y otros elementos genéticos, el término “heterólogo” indica que el elemento procede de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara. Por ejemplo, un promotor o gen introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un animal de una especie diferente se denomina polinucleótido heterólogo. Un elemento genético “endógeno” es un elemento que está en el mismo lugar del cromosoma en el cual está en la naturaleza, aunque se pueden introducir artificialmente otros elementos en una posición cercana.

[00033] Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede comprender aminoácidos modificados, puede ser lineal o ramificado y puede tener intercalados no aminoácidos.

[00034] Si no se especifica lo contrario, los términos “compuesto”, “sustancia” y “composición (química)” se usan indistintamente en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, agentes terapéuticos (o potenciales agentes terapéuticos), aditivos alimentarios y productos nutracéuticos, agentes de toxicidad conocida tales como neurotoxinas, toxinas hepáticas, toxinas de células hematopoyéticas, miotoxinas, carcinógenos, teratógenos o toxinas de uno o más órganos reproductores. Las composiciones químicas pueden ser además productos químicos agrícolas, tales como pesticidas, fungicidas, nematocidas y fertilizantes, cosméticos, incluyendo los denominados “productos cosmecéuticos”, residuos o subproductos industriales o contaminantes ambientales. También pueden ser productos terapéuticos de origen animal o potenciales productos terapéuticos de origen animal. Los productos industriales que se pueden ensayar con los procedimientos de la presente invención incluyen blanqueadores, pastillas para inodoro, lavavajillas líquidos, jabón en polvo y líquido, suavizantes para materiales textiles, productos de limpieza para ventanas, hornos, suelos, baños, cocinas y alfombras, detergentes para lavavajillas y agentes de aclarado, agentes ablandadores de agua, descalcificadores, quitamanchas, brillantadores, productos oleosos, pinturas, decapantes para pinturas, pegamentos, disolventes, barnices, ambientadores, antipollas e insecticidas.

[00035] Constantemente se desarrollan nuevos ingredientes para productos de uso doméstico y es necesario su ensayo. Por ejemplo, en los últimos años se han desarrollado nuevas enzimas (para digerir manchas) y

“blanqueadores ópticos” (que hacen que la colada parezca más blanca) para uso en detergentes líquidos y en polvo. Se han desarrollado nuevos tensioactivos (que atraviesan la grasa para eliminar la suciedad incrustada) y “coadyuvantes” químicos (que actúan como ablandadores del agua y posibilitan que los tensioactivos actúen más eficazmente) para uso en detergentes líquidos y en polvo, lavavajillas líquidos y agentes limpiadores. Pero también se tienen que ensayar materiales médicos, por ejemplo, materiales dentales tales como nuevos polímeros de relleno, aleaciones metálicas y cerámicos bioactivos. Además, las composiciones químicas de cualquier pieza de un dispositivo, tales como catéteres, electrodos, adhesivos, pasta, gel o crema, se pueden ensayar con el procedimiento de la presente invención en diferentes concentraciones y con diferentes ingredientes e impurezas presentes.

[00036] Los compuestos que se van a cribar también se pueden obtener de diversas bibliotecas, tales como bibliotecas peptídicas aleatorias o combinatorias o no peptídicas. En la técnica se conocen muchas bibliotecas que se pueden usar, p. ej., bibliotecas químicamente sintetizadas, recombinantes (p. ej., bibliotecas de expresión en fagos) y bibliotecas basadas en traducción *in vitro*.

[00037] Ejemplos de bibliotecas químicamente sintetizadas se describen en Fodor y col., Science 251 (1991), 767-773; Houghten y col., Nature 354 (1991), 84-86; Lam y col., Nature 354 (1991), 82-84; Medynski, Bio/Technology 12 (1994), 709-710; Gallop y col., J. Medicinal Chemistry 37(9), (1994), 1233-1251; Ohlmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 90 (1993), 10922-10926; Erb y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 91 (1994), 11422-11426; Houghten y col., Biotechniques 13 (1992), 412; Jayawickreme y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 91 (1994), 1614-1618; Salmon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 90 (1993), 11708-11712; solicitud internacional WO93/20242; y Brenner y Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 89 (1992), 5381-5383.

[00038] Ejemplos de bibliotecas de expresión en fagos se describen en Scott y Smith, Science 249 (1990), 386-390; Devlin y col., Science 249 (1990), 404-406; Christian y col., J. Mol. Biol. 227 (1992), 711-718; Lenstra, J. Immunol. Meth. 152 (1992), 149-157; Kay y col., Gene 128 (1993), 59-65; y la solicitud internacional WO94/18318.

[00039] Bibliotecas basadas en traducción *in vitro* incluyen, pero no limitan a, las descritas en la solicitud internacional WO91/05058; y Mattheakis y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 91 (1994), 9022-9026.

[00040] A modo de ejemplos de bibliotecas no peptídicas, se puede adaptar una biblioteca de benzodiazepinas (véase, p. ej., Bunin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 91 (1994), 4708-4712) para su uso. También se pueden usar bibliotecas de péptidos (Simon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 89 (1992), 9367-9371). Otro ejemplo de una biblioteca que se puede usar, en la cual los grupos funcionales amida en péptidos se han permitilado para generar una biblioteca combinatoria químicamente transformada, se describen en Ostresh y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 91 (1994), 11138-11142.

[00041] El cribado de las bibliotecas se puede llevar a cabo mediante cualquiera de diversos procedimientos comúnmente conocidos; véanse, p. ej., las siguientes referencias, que desvelan el cribado de bibliotecas peptídicas: Parmley y Smith, Adv. Exp. Med. Biol. 251 (1989), 215-218; Scott y Smith, Science 249 (1990), 386-390; Fowlkes y col., BioTechniques 13 (1992), 422-427; Oldenburg y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 89 (1992), 5393-5397; Yu y col., Cell 76 (1994), 933-945; Staudt y col., Science 241 (1988), 577-580; Bock y col., Nature 355 (1992), 564-566; Tuerk y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 89 (1992), 6988-6992; Ellington y col., Nature 355 (1992), 850-852; patente estadounidense nº 5.096.815, patente estadounidense nº 5.223.409 y patente estadounidense nº 5.198.346; Rebar y Pabo, Science 263 (1993), 671-673; y la solicitud internacional WO94/18318.

[00042] Tal como se usa en el presente documento, “perfil” u “obtención del perfil” de una composición química o compuesto se refiere a un patrón de modificaciones en la expresión de proteínas o genes, o ambos, o de propiedades fisiológicas en una célula ES, cuerpo embrioide o tejido en contacto sólo con medio de cultivo.

[00043] La diferenciación es el procedimiento por el cual células relativamente no especializadas (p. ej., citoblastos) adquieren características estructurales y/o funcionales especializadas típicos de células maduras. De forma similar, “diferenciar” se refiere a este procedimiento. Típicamente, durante la diferenciación, la estructura celular se modifica y aparecen proteínas tisulares específicas.

[00044] El término “enfermo” se usa, en el presente documento, para indicar una célula, tejido u órgano en los cuales se ha producido o que han sido modificados por o que manifiestan una enfermedad o patología. Por ejemplo, un “cardiomiocito enfermo” puede ser un cardiomiocito “miopático”, es decir, un cardiomiocito que padece una cardiomiopatía. La expresión “fenotipo de enfermedad” se usa en el presente documento para indicar que una célula, que si no sería considerada una célula enferma, no procede originalmente de un tejido u órgano enfermos, si no que se ha inducido *in vitro* para que exprese básicamente el mismo fenotipo que dicha célula enferma. El término “patológico” o “patológico” se puede usar de forma indistinta con el término “enfermo”.

Técnicas generales

[00045] Para detalles adicionales de técnicas generales útiles para la puesta en práctica de la presente invención, el profesional puede consultar libros de texto estándar y revisiones de biología celular, cultivos tisulares, embriología y cardiofisiología.

5 **[00046]** Respecto al cultivo tisular y embriocitos indiferenciados, se puede hacer referencia: Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach (Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); Guide to Techniques in Mouse Development (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). Respecto al cultivo de células cardiacas, la bibliografía estándar incluye The Heart Cell in Culture (Pinson ed., CRC Press 1987); Isolated Adult Cardiomyocytes (Vols. I y II, Piper & Isenberg eds., CRC Press 1989); y Heart Development (Harvey & Rosenthal, Academic Press 1998).

15 **[00047]** Procedimientos generales en bioquímica celular y molecular se pueden encontrar en libros de texto estándares tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Sambrook y col., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. (Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag y col., John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner y col. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Los reactivos, vectores de clonación y kits para manipulación genética a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva están disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich y ClonTech.

25 Descripción detallada de la invención

[00048] La presente invención no se refiere a la utilización de células derivadas de un embrión humano.

30 **[00049]** La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar y/o obtener un fármaco para la mejora o tratamiento de una enfermedad o para determinar la toxicidad de un compuesto que comprende (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende una célula diferenciada *in vitro* con una sustancia de ensayo que se va a cribar, en el que en dicha célula se induce la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula, tejido u órgano enfermos; y (b) determinar un cambio sensible del fenotipo en dicha muestra de ensayo, en el que un cambio sensible (i) que evite o retrase el inicio o la progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de un fármaco útil; y (ii) si potencia el inicio o progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de la toxicidad del compuesto.

35 **[00050]** La presente invención se basa en la observación de que los cardiomiocitos diferenciados *in vitro* derivados de embriocitos indiferenciados tras estímulos hormonales se comportan básicamente del mismo modo que las correspondientemente tratadas células de tejido cardiaco aisladas de ratas neonatales; véase el Ejemplo 1. En concreto, se podría inducir un fenotipo de enfermedad en las células diferenciadas *in vitro* que se asemeje al fenotipo observado en células de tejido cardiaco adultas. Por tanto, según la presente invención, se ha podido demostrar, sorprendentemente, que las células diferenciadas *in vitro* son adecuadas y apropiadas para sustituir células cardiomiopáticas obtenidas del corazón y, por tanto, se pueden usar para el cribado de sustancias, por ejemplo, tales como las que influyen en la respuesta de los cardiomiocitos a la estimulación hormonal.

40 **[00051]** Sin desear quedar supeditados a teoría alguna, gracias a los experimentos realizados según la presente invención, se cree que se puede inducir, en células derivadas de células multipotentes, en concreto de embriocitos indiferenciados, diferenciadas *in vitro* en un tipo de célula o tejido concretos, la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que, básicamente, se asemeja al fenotipo de enfermedad de células y tejido derivados de un sujeto que padece la enfermedad. Por tanto, por primera vez se proporciona una fuente fiable de células que se puede usar para estudiar los efectos terapéuticos y tóxicos, respectivamente, de fármacos y otros compuestos. En concreto, ahora es posible determinar, en un ensayo celular *in vitro*, si un supuesto fármaco es capaz de evitar el inicio de una enfermedad o al menos de atenuar su progresión; véase, p. ej., el Ejemplo 3.

50 **[00052]** Además de la fácil disponibilidad de preparaciones celulares estandarizadas, una ventaja adicional del uso de células diferenciadas *in vitro* consiste en que las células se pueden modificar fácilmente mediante ingeniería genética de diversos modos, por ejemplo, manipulando las células multipotentes, tales como los embriocitos indiferenciados que sirvieron como el material de partida para la diferenciación *in vitro*.

60 **[00053]** También se pueden modificar genéticamente de forma eficaz cardiomiocitos procedentes de animales (Sen y col., J. Biol. Chem. 263 (1988), 19132-19136; Bonci y col., Gene Ther. 10 (2003), 630-636). Sin embargo, tal modificación se tiene que realizar para cada preparación celular o se tiene que producir un animal transgénico para todas y cada una de las modificaciones deseadas para obtener células para los análisis *in vitro*.

5 [00054] Por el contrario, la presente invención permite una generación eficaz y rápida de múltiples células diferenciadas *in vitro*, lo que también conduce a sistemas de cribado a escala industrial. De esta forma, por ejemplo, también se pueden modificar embriocitos indiferenciados para expresar un gen indicador para facilitar una lectura del ensayo con las células diferenciadas *in vitro*.

10 [00055] Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar y/o obtener un fármaco para la mejora o tratamiento de una enfermedad o para determinar la toxicidad de un compuesto que comprende (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende una célula diferenciada *in vitro* con una sustancia de ensayo que se va a cribar, en el que en dicha célula se induce la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula, tejido u órgano enfermos; y (b) determinar un cambio sensible del fenotipo en dicha muestra de ensayo, en el que un cambio sensible (i) que evite o retrase el inicio o la progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de un fármaco útil; y (ii) si potencia el inicio o progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de la toxicidad del compuesto.

15 [00056] Para evaluar el efecto de un compuesto de ensayo en las células diferenciadas *in vitro*, dichas células se mantiene preferiblemente en un medio sin nutrientes antes de la adición del compuesto de ensayo; véanse también Ejemplos 1 a 3. En varios ejemplos no limitativos, las células diferenciadas *in vitro* aisladas se mantiene en un medio sin suero entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 4 días, preferiblemente entre aproximadamente 12
20 horas y aproximadamente 2 días y, lo más preferible, aproximadamente 24 horas, antes de la inducción del fenotipo de enfermedad, por ejemplo, mediante la adición de un agente fisiológicamente activo capaz de inducir dicho fenotipo y/o la adición del compuesto de ensayo; véanse Ejemplos 1 a 3.

25 [00057] Las células diferenciadas *in vitro*, en las cuales se ha inducido la expresión de un fenotipo de enfermedad según la presente invención, se pueden usar para cribar factores (tales como disolventes, fármacos de moléculas pequeñas, péptidos, oligonucleótidos) o condiciones ambientales (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que producen un cambio fenotípico de tales células. El cribado se puede realizar bien debido a que el compuesto está diseñado para tener un efecto farmacológico sobre las células o bien porque un compuesto diseñado para tener efectos en cualquier otro lugar puede tener efectos secundarios no pretendidos sobre las células de este tipo de
30 tejido. El cribado se puede llevar a cabo usando cualquiera de las células diferenciadas *in vitro* de la invención.

[00058] De forma general, se pueden consultar el libro de texto estándar *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997, y la patente estadounidense nº 5.030.015. La evaluación de la actividad de los compuestos farmacéuticos candidatos generalmente implica combinar las células diferenciadas de la presente
35 invención con el compuesto candidato, bien sólo o en combinación con otros fármacos. El investigador determina cualquier cambio en la morfología, fenotipo del marcador o actividad funcional de las células que se pueda atribuir al compuesto (en comparación con células no tratadas o células tratadas con un compuesto inerte) y, a continuación, correlaciona el efecto del compuesto con el cambio observado. El fenotipo de enfermedad, así como los cambios fenotípicos producidos por el compuesto de ensayo sobre las células diferenciadas *in vitro* puestas en contacto con un agente, se pueden evaluar mediante cualquier medio conocido por un experto en la materia. En una realización, se examina la morfología, por ejemplo, se usa microscopía (electrónica) para evaluar la (ultra)estructura de las células; véanse Ejemplo 1 y Figura 1. Parámetros adecuados para la evaluación incluyen, pero no se limitan a, la evaluación de las zonas de espacio entre las células en contacto, tales como cardiomiocitos. En otras realizaciones se usan técnicas inmunohistoquímicas o de inmunofluorescencia para evaluar el fenotipo; véanse Ejemplo 1 y Figura
40 2. En una realización adicional, los cambios fenotípicos se evalúan mediante el análisis de la expresión de moléculas de ARNm específicas expresadas en las células enfermas. Sistemas de ensayo adecuados incluyen, pero no se limitan a, RT-PCR, hibridación *in situ*, análisis tipo Northern o ensayo de protección frente a RNAsas; véanse Ejemplos 1 a 3, así como Figuras 3 y 4. En una realización adicional, se ensayan los niveles de polipéptidos expresados en las células diferenciadas. Ejemplos específicos no limitativos de ensayos con polipéptidos que se pueden usar incluyen análisis por transferencia Western, ensayo ELISA o inmunofluorescencia. Alternativamente, se mide la corriente transitoria de calcio, como se describe posteriormente.

45 [00059] El ensayo también se puede usar para el cribado del efecto de un agente sobre la función de una célula, p. ej., función de los cardiomiocitos. Se puede usar cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia para evaluar la función cardiaca. En una realización, se ensaya la frecuencia de latido de un cardiomiocito para identificar agentes que aumenten o disminuyan el latido. Un procedimiento para evaluar la frecuencia de latido es observar el latido con un microscopio. Los agentes que se pueden cribar de este modo incluyen fármacos inotrópicos, tales como agentes simpatomiméticos. En una realización, las células puestas en contacto con el agente se comparan con una muestra de control. Muestras de control adecuadas incluyen células que no se han puesto en contacto con el agente o que se han puesto en contacto sólo con el vehículo. También se pueden usar como control los valores
50 estándar.

[00060] La citotoxicidad se puede determinar, en primer lugar, mediante el efecto sobre la viabilidad, supervivencia y morfología celulares y mediante la expresión de determinados marcadores y receptores. Los efectos de un

fármaco sobre el ADN cromosómico se puede determinar midiendo la síntesis o reparación del ADN. La incorporación de [³H]-timidina o BrdU, especialmente en momentos del ciclo celular en los cuales no está prevista o por encima del nivel necesario para la replicación celular, concuerda con un efecto del fármaco. Efectos no deseados pueden incluir también las tasas no habituales de intercambio de cromátidas hermanas, determinadas por el avance de la metafase. Se puede consultar el documento A. Vickers (375-410), *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997, para más detalles.

[00061] El efecto de la función celular se puede evaluar usando cualquier ensayo estándar para observar el fenotipo o, por ejemplo, la actividad de los cardiomiocitos, tales como expresión de marcadores, unión a receptores, actividad contráctil o electrofisiología en cultivo celular. Los candidatos farmacéuticos también se pueden ensayar respecto a su efecto sobre la actividad contráctil, tal como si aumenta o disminuye el grado o frecuencia de la contracción. Cuando se observa un efecto, la concentración del compuesto se puede titular para determinar la dosis media eficaz.

[00062] Los ensayos pueden ser ensayos simples tipo "sí/no" para determinar si hay un cambio sensible en comparación con una muestra de control. El compuesto de ensayo o una pluralidad de compuestos de ensayo también se pueden someter a la célula de ensayo, preferiblemente al cuerpo embrioide, en diferentes concentraciones o series de dilución, preferiblemente en dosis que correspondan a los niveles fisiológicos del correspondiente tipo de compuesto de ensayo. Por tanto, también es posible generar fácilmente perfiles de los compuestos con fines similares a los descritos en el documento WO00/34525. Por ejemplo, se pueden usar dos o más ensayos y/o se pueden evaluar dos o más parámetros. Dichos ensayos/parámetros se pueden realizar/evaluar simultánea o consecutivamente; o los resultados de un ensayo se pueden comparar con los resultados de un ensayo correspondiente realizado en otro sitio. Cuando se ha determinado el perfil molecular de la composición de ensayo, se puede comparar con el de una composición química con actividades biológicas predeterminadas o, preferiblemente, con una biblioteca de perfiles moleculares de composiciones químicas con actividades biológicas predeterminadas. El resultado de tal comparación proporciona información para predecir la probabilidad de que la composición de ensayo tenga el potencial de un fármaco o sea tóxica, qué tipo de toxicidad y cómo de tóxica sería en comparación con otras composiciones tóxicas conocidas.

[00063] En una realización concreta de la presente invención, dicho compuesto de ensayo se somete a la muestra de ensayo antes o durante la inducción del inicio del fenotipo de enfermedad. La realización del procedimiento de la invención se puede llevar a cabo según procedimientos de cribado en la técnica usando preparaciones celulares de origen animal. Por ejemplo, los efectos de la doxorubicina (DOX) sobre las corrientes transitorias de calcio intracelular y los efectos cardioprotectores de un antagonista del calcio sobre el daño inducido por DOX en la asimilación de calcio se examinaron en miocitos cardiacos cultivados de rata neonatal; véase Maeda y col., *Jpn. Circ. J.* 63 (1999), 123-129. Aquí, los miocitos cardiacos cultivados aislados de ratas Wistar-Kyoto neonatales se trataron con DOX durante 24 h. Se midió la corriente transitoria de calcio estimulada por un campo en presencia o ausencia de isoproterenol usando fura-2/AM. La corriente transitoria de calcio se midió también después de la adición de DOX a miocitos pretratados con el antagonista de calcio benidipina. Según la presente invención, las células diferenciadas *in vitro* se usan para el cribado de compuestos cardioprotectores. El documento Ichiba y col., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30 (1998), 1105-1114, describe experimentos sobre la regulación de concentraciones de calcio intracelular con calcio y magnesio en soluciones cardioplégicas protege a los miocitos neonatales de rata de una isquemia provocada. Asimismo, las células diferenciadas *in vitro* se someten a isquemia provocada según la presente invención y se usan para identificar compuestos y factores que influyen sobre el efecto cardioprotector de disoluciones cardioplégicas.

[00064] La regulación diferencial de isoenzimas fosfolipasa C-beta en la hipertrofia de cardiomiocitos se ha descrito en el documento Schnabel y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (2000), 1-6. Aquí se investigó el patrón de expresión de la subfamilia de isoenzimas PLC-beta en cardiomiocitos de rata neonatal tras estimulación con diferentes estímulos hipertróficos y se ha ensayado el efecto de diversos compuestos tales como el antagonista del receptor del IGF-I mediante preincubación de los cardiomiocitos con el compuesto. Según la presente invención, tal ensayo de compuestos ahora se puede realizar de forma sencilla y fiable con cardiomiocitos diferenciados *in vitro*.

[00065] Generalmente, dicha célula diferenciada *in vitro* procede de células pluripotentes o multipotentes, preferiblemente de embrionarios (células ES), lo más preferible, procediendo dicha célula pluripotente o multipotente procede de ratón o rata.

[00066] La invención se puede poner en práctica usando citoblastos de cualquier especie de vertebrado. Están incluidos citoblastos de humanos, pero no células de un embrión humano; así como de primates no humanos, animales domésticos, ganado y otros mamíferos no humanos. Entre los citoblastos adecuados para uso en la presente invención se encuentran citoblastos pluripotentes de primates procedentes de tejido formado tras la gestación, tal como un blastocisto, o tejido fetal o embrionario extraído en cualquier momento durante la gestación. Ejemplos no limitativos son cultivos primarios o líneas establecidas de embrionarios indiferenciados. La invención también es aplicable a células precursoras histoespecíficas. Se hace referencia a las publicaciones Anderson y col.,

Nat. Med. 7 (2001), 393-395; Gage, Science 287 (2000), 433-438, y Prockop, Science 276 (1997), 71-74, en las cuales se describe la extracción y cultivo de dichas células.

5 **[00067]** Los medios para aislar y propagar citoblastos pueden tener cualquiera de diversas fórmulas diferentes, siempre y cuando las células obtenidas tengan las características deseadas y se puedan seguir propagando. Fuentes adecuadas incluyen medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), Gibco, nº 12440-053; medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco nº 11965-092; medio de Eagles modificado por Dulbecco inactivado (KO DMEM), Gibco, nº 10829-018; L-glutamina 200 mM, Gibco, nº 15039-027; disolución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050; [beta]-mercaptoetanol, Sigma nº M7522; factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) recombinante humano, Gibco nº 13256-029. Se conocen ejemplos de medios con suero para células ES y de condiciones para el cultivo de citoblastos y se pueden optimizar adecuadamente según el tipo de célula. En las referencias citadas en el presente documento se proporcionan técnicas de cultivo y medios para los tipos de célula concretos a los que se hace referencia en la sección anterior.

15 **[00068]** Los embriocitos indiferenciados se pueden aislar a partir de blastocistos de miembros de la especie de los primates (Thomson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 92 (1995), 7844).

[00069] Recientemente, se ha tenido conocimiento de que los dientes de leche humanos laminados, un tejido comparable muy accesible, contiene citoblastos multipotentes que se han identificado como una población muy proliferativa, células clonogénicas capaces de diferenciarse en diversos tipos de células incluyendo células neuronales, adipocitos y odontoblastos; véase Miura y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 100 (2003), 5807-5812. Después del trasplante *in vivo*, se descubrió que dichas células son capaces de inducir la formación de hueso, generar dentina y sobrevivir en cerebro de ratón con expresión de marcadores neuronales. Además, el potencial multiestirpe de citoblastos homocigóticos derivados de ovocitos en metafase II ha sido descrito por Lin y col. en el documento Stem Cells 21 (2003), 152-161. En el documento Grounds y col. J. Histochem. Cytochem. 50 (2002), 589-610, se recogen diversas fuentes de células precursoras en músculos postnatales y los factores que pueden favorecer la participación de los citoblastos en la formación de músculo cardíaco y esquelético nuevo *in vivo*. La purificación de citoblasto(s) hematopoyético(s) (HSC) extraño(s) hasta homogeneidad que conducen a médula ósea se describe en el documento US2003/0032185. Se describe que estas células de médula ósea adultas poseen una gran capacidad de diferenciación puesto que también se pueden diferenciar en células epiteliales de hígado, pulmón, tracto GI y piel. Este hallazgo puede contribuir al tratamiento clínico de una enfermedad genética o reparación tisular. Además, se pueden usar técnicas tales como la transferencia nuclear para la reconstrucción de embriones en los que los núcleos diploides del donante se trasplantan a ovocitos MII desnucleados. Esta tecnología, junto con otros procedimientos que ayudan al establecimiento de líneas celulares de embriocitos indiferenciados (células ES) personalizadas que son genéticamente idénticas a las del receptor, ha sido recogida en el documento Colman y Kind, Trends Biotechnol. 18 (2000), 192-196. Para evitar el rechazo del injerto relacionado con células alógenas o xenógenas en el trasplante, preferiblemente se usan células y receptores singénicos o autólogos en las realizaciones correspondientes de la invención. En vista de las recientes fuentes de citoblastos descubiertas, tales como la médula ósea y dientes, debería ser posible satisfacer este requisito sin necesidad de recurrir a células y tejido embrionarios. Alternativamente, las células se pueden manipular genéticamente para eliminar los antígenos de trasplante pertinentes; véase también posteriormente en el presente documento, se pueden usar agentes inmunosupresores.

45 **[00070]** El campo de la tecnología de los citoblastos está siendo recogido en el documento Kiessling y Anderson, Harvard Medical School, Human Embryonic Stem Cells: An Introduction to the Science and Therapeutic Potential; (2003) Jones and Bartlett Publishers; ISBN: 076372341X.

50 **[00071]** A efectos de evitar el uso de, por ejemplo, embriones humanos como donantes de citoblastos, que, sin embargo, parece ser justificable, como mínimo, bajo ciertas circunstancias, podría ser incluso posible usar animales no humanos transgénicos, en concreto mamíferos, como fuente de embriocitos indiferenciados. Por ejemplo, en la patente estadounidense nº 5.523.226 se describen composiciones y procedimientos para producir cerdos transgénicos para uso como donantes de xenoinjertos. Asimismo, el documento WO97/12035 describe procedimientos de producción de animales transgénicos para xenotrasplantes. Además, en el documento WO01/88096 se describe tejido animal inmunológicamente compatible, adecuado para xenotrasplantes en pacientes humanos. El procedimiento para producir células germinales embrionarias a partir de porcinos se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 6.545.199. También se pueden usar células inmunológicamente compatibles con humanos para los propósitos de la presente invención.

60 **[00072]** Los citoblastos se pueden propagar de forma continua en cultivo, usando una combinación de condiciones de cultivo que favorezcan la proliferación sin favorecer la diferenciación. Tradicionalmente, los citoblastos se cultivan sobre una capa de células sustrato, típicamente células tipo fibroblastos, a menudo procedentes de tejido embrionario o fetal. Las líneas celulares se colocan en placas para favorecer la confluencia, habitualmente irradiadas para evitar la proliferación, y, a continuación, se usan como soporte cuando se cultivan en un medio acondicionado con 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 del factor inhibidor de la leucemia (LIF). Tales células pueden crecer de forma relativamente indefinida usando las condiciones de cultivo apropiadas sin diferenciación.

5 **[00073]** En ausencia de células sustrato, factor exógeno inhibidor de la leucemia (LIF) o medio acondicionado, las células ES o EG se diferencian espontáneamente en diversos tipos de células, incluyendo las células que se encuentran en cada una de las capas germinales del endodermo, mesodermo y ectodermo. Con la combinación apropiada de factores de crecimiento y diferenciación, sin embargo, se puede controlar la diferenciación celular. Por ejemplo, las células ES y EG de ratón pueden generar células de la estirpe hematopoyética *in vitro* (Keller y col., Mol. Cell. Biol. 13 (1993), 473-486; Palacios y col., Proc. Natl. Acad. Sci EEUU 92 (1995), 7530-7534; Rich, Blood 86 (1995), 463-472). Adicionalmente, se han usado células ES de ratón 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 de músculo cardiaco) (Klug y col., Am. J. Physiol. 269 (1995), H1913-H1921), células de músculo esquelético (Rohwedel y col., Dev. Biol. 164 (1994), 87-101) y células vasculares (Wang y col., Development 114 (1992), 303-316); la patente estadounidense nº 5.773.255 se refiere a líneas de células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a la glucosa, la patente estadounidense nº 5.789.246 se refiere a células precursoras de hepatocitos. La diferenciación hepática de embriocitos indiferenciados murinos también se describe en el documento Jones y col., Exp. Cell Res. 272 (2002), 15-22. Otras células precursoras de interés incluyen, pero no se limitan a, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales de pigmento retinoico, fibroblastos, células de piel tales como queratinocitos, células dendríticas, células de folículo piloso, células epiteliales de conductos renales, células de músculo liso y esquelético, células precursoras testiculares y células endoteliales vasculares. Los modelos de diferenciación de embriocitos indiferenciados para cardiogénesis, miogénesis, neurogénesis, diferenciación de células de músculo liso vasculares y epiteliales *in vitro* se han descrito de forma general en el documento Guan y col., Cytotechnology 30 (1999), 211-226.

25 **[00074]** En la solicitud de patente estadounidense US2002/142457 se describen cardiomiocitos, hepatocitos, adipocitos, células de músculo esquelético, células endoteliales vasculares y osteoblastos diferenciados *in vitro*. La preparación de células de la estirpe de cardiomiocitos producidas por citoblastos pluripotentes humanos se describe en la solicitud internacional WO03/006950; véanse también las referencias citadas en dicho documento. En la solicitud internacional WO03/035838 se describe un procedimiento para la generación de cardiomiocitos diferenciados *in vitro* a partir de citoblastos denominados células SPOC. La producción de poblaciones celulares enriquecidas en cardiomiocitos y los procedimientos y materiales para obtener las mismas se describen también en la solicitud internacional WO01/68814.

35 **[00075]** En determinadas realizaciones de la invención, la diferenciación es favorecida extrayendo uno o más componentes del medio que favorecen el crecimiento de células no diferenciadas o que actúan como un inhibidor de diferenciación. Ejemplos de tales componentes incluyen determinados factores de crecimiento, mitógenos, el factor inhibidor de leucocitos (LIF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). La diferenciación también puede ser favorecida añadiendo un componente del medio que favorezca la diferenciación hacia la estirpe celular deseada o inhiba el crecimiento de células con características no deseadas.

40 **[00076]** Puede ser deseable que las células tengan la capacidad de replicarse para el cribado y aplicaciones terapéuticas de determinados fármacos y de proporcionar una reserva para la generación de células diferenciadas *in vitro*, tales como cardiomiocitos y sus precursores. Opcionalmente, las células de la presente invención se pueden telomerizar para aumentar su potencial de replicación, bien antes o bien después de que progresen hasta células de estirpes de desarrollo restringido o células diferenciadas de forma terminal. Las células ES que se telomerizan se pueden tomar al acabar la ruta de diferenciación descrita anteriormente; o las células diferenciadas se pueden telomerizar directamente.

50 **[00077]** Las células se telomerizan modificando genéticamente las mismas mediante transfección o transducción con un vector adecuado, recombinación homóloga u otra técnica adecuada, de forma que expresen el componente catalítico de la telomerasa (TERT), típicamente por la acción de un promotor heterólogo que aumenta la expresión de la telomerasa en mayor medida de lo que sucede por la acción del promotor endógeno. Es especialmente adecuado el componente catalítico de telomerasa humana (hTERT), proporcionado en la solicitud internacional WO98/14592. En determinadas aplicaciones también se puede usar TERT de ratón tipo homóloga de la especie. La transfección y expresión de la telomerasa en células humanas se describe en los documentos Bodnar y col., Science 279 (1998), 349, y Jiang y col., Nat. Genet. 21 (1999), 111. En otro ejemplo, se usan clones de hTERT (WO98/14592) como fuente de la secuencia codificante de hTERT y se cortan y empalman en un sitio EcoRI de un vector PBBS212 bajo el control del promotor de MPSV o en el lugar EcoRI de un vector retroviral pBABE, disponibles en el mercado, bajo el control del promotor (de) LTR.

60 **[00078]** A continuación, se puede evaluar la expresión de hTERT mediante RT-PCR, actividad de la telomerasa (ensayo TRAP), tinción inmunocitoquímica de la hTERT o capacidad de replicación; véase también anteriormente en el presente documento.

5 [00079] Las colonias en continua replicación se enriquecerán mediante cultivo adicional en condiciones que permitan la proliferación y las células con fenotipos deseables, opcionalmente, se pueden clonar limitando la dilución. Dependiendo del uso previsto de la células, también son aceptables otros procedimientos de immortalización, tales como transformar las células con myc codificante de ADN, antígeno T grande del SV40 o MOT-2 (patente estadounidense n° 5.869.243; solicitudes internacionales WO97/32972 y WO01/23555).

10 [00080] Según la presente invención, las poblaciones de células diferenciadas que se usarán en el ensayo preferiblemente se limpian de células relativamente no diferenciadas y/o células de tipos de células no deseados usando un sistema de selección que es mortal para las células y los tipos de células no deseados, es decir, expresando un gen marcador seleccionable que haga las células de un tipo de células específico resistentes al efecto mortal de un agente externo, bajo el control de una secuencia reguladora que hace que el gen se exprese preferiblemente en el tipo de célula deseado y/o en una determinada fase de desarrollo. Para lograrlo, las células se modifican genéticamente antes del procedimiento usado para diferenciar las células en la estirpe deseada para terapia, de forma que las células comprenden un marcador seleccionable operativamente relacionado con una primera secuencia reguladora específica para un tipo de célula específica para el primer tipo de célula deseado.

20 [00081] Se puede usar cualquier vector de expresión adecuado con este propósito. Se pueden preparar sistemas de vectores víricos adecuados para producir citoblastos modificados según la invención usando componentes de virus disponibles en el mercado. La introducción de la construcción o construcciones de vector en los embriocitos indiferenciados se realiza de forma conocida, p. ej., mediante transfección, electroporación, lipofección o con la ayuda de vectores víricos. Los vectores víricos que comprenden genes efectores se describen de forma general en las publicaciones citadas en la última parte del documento. Alternativamente, se pueden introducir plásmidos de vectores en las células por electroporación o usando complejos lípido/ADN. Un ejemplo es la formulación Lipofectamine 2000(TM), disponible en Gibco/Life Technologies. Otro ejemplo de reactivo es el reactivo de transfección FuGENE(TM) 6, una mezcla de lípidos en forma no liposómica y otros compuestos en 80% de etanol, que se puede obtener en Roche Diagnostics Corporation. Preferiblemente, se usan las construcciones de vector y procedimientos descritos en el documento WO02/051987.

30 [00082] Los genes resistentes son conocidos *per se*. Ejemplos de estos genes resistentes a antibióticos de nucleósidos y aminoglicósidos son, p. ej., puromicina (puromicina-N-acetiltransferasa), estreptomycin, neomicina, gentamicina o higromicina. Ejemplos adicionales de genes resistentes son deshidrofolato-reductasa, que confiere resistencia frente a la aminopterina y al metotrexato, así como genes resistentes a múltiples fármacos, lo que confiere resistencia frente a varios antibióticos, p. ej., frente a vinblastina, doxorubicina y actinomicina D.

35 [00083] En una realización especialmente preferible de la presente invención, dicho marcador seleccionable confiere resistencia a la puromicina. La puromicina es especialmente adecuada para una rápida eliminación de células no cardíacas en cultivos adherentes de EB transgénicos; véanse también los Ejemplos. Además, la selección de fármacos de células cardíacas se puede implementar completamente en el cultivo en suspensión de EB transgénicos. Por tanto, también se podría demostrar que los cardiomiocitos derivados de ES purificados sobreviven mucho más tiempo en cultivo que sus homólogos no tratados. Además, la eliminación de células ES no diferenciadas durante el procedimiento de selección ha demostrado tener un claro efecto positivo sobre la viabilidad y longevidad de tales células derivadas de ES diferenciadas, como los cardiomiocitos. Además, se podría demostrar, sorprendentemente, que la liberación de células no diferenciadas circundantes induce la proliferación de cardiomiocitos. Por tanto, la selección de fármacos posee efecto tanto purificador como multiplicador.

45 [00084] En una realización preferible de la invención, dicha célula ES de dicho primer tipo de célula derivado de células ES comprende un gen indicador, en las que el gen indicador está operativamente relacionado con una primera secuencia reguladora específica para un tipo de célula específica para dicho primer tipo de célula. Este tipo de vector tiene las ventajas de proporcionar visualización de la diferenciación, definición del momento de tiempo para que comience la selección de fármacos, visualización de la selección de fármacos y rastreo del destino de las células purificadas injertadas en tejido receptor. Tales vectores, que se usan preferiblemente según los procedimientos de la presente invención, se describen en el documento WO02/051987. Habitualmente, dicha secuencia reguladora específica para un tipo de célula del gen indicador es básicamente la misma que dicha primera secuencia reguladora específica para un tipo de célula del gen marcador. Ventajosamente, esto se puede lograr poniendo dicho gen marcador y dicho gen indicador en la misma molécula de ácido nucleico recombinante, es decir, el vector usado para la transfección de citoblastos, preferiblemente de forma que dicho gen marcador y dicho gen indicador estén contenidos en el mismo cistrón.

60 [00085] El indicador puede ser de cualquier tipo siempre que no sea perjudicial para la célula y confiera un fenotipo que se pueda observar o medir. Según la presente invención, se pueden usar la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* (descrita en los documentos WO95/07463, WO96/27675 y WO95/21191) y sus derivados "GFP azul" (Heim y col., Curr. Biol. 6 (1996), 178-182) y "GFP mutada roja" (Muldoon y col., Biotechniques 22 (1997), 162-167). Es especialmente preferible la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP). Realizaciones adicionales son las proteínas fluorescentes amarillo y cian mejoradas (EYFP y ECFP, respectivamente) y las

proteínas fluorescentes rojas (DsRed, HcRed). Proteínas fluorescentes adicionales son conocidas por los expertos en la materia y se pueden usar según la invención siempre que no dañen las células. La detección de proteínas fluorescentes tiene lugar mediante procedimientos de detección de fluorescencia conocidos *per se*; véase, p. ej., el documento Kolosov y col., J. Cell Biol. 143 (1998), 2045-2056. Alternativamente a las proteínas fluorescentes, especialmente para aplicaciones *in vivo*, también se pueden usar otras proteínas detectables, especialmente epítomos de dichas proteínas. También se pueden usar epítomos de proteínas, proteínas que aunque puede de dañar la célula *per se*, cuyos epítomos no dañen las células; véase también el documento WO02/051987.

[00086] Para la selección de células ES establemente transfectadas, las construcciones de vectores contienen un gen marcador seleccionable adicional que confiere, p. ej., resistencia frente a un antibiótico, p. ej., neomicina. Por supuesto, también se pueden usar otros genes resistentes conocidos, p. ej., los genes resistentes descritos anteriormente en asociación con los genes codificantes de proteínas fluorescentes. El gen de selección para la selección para células ES establemente transfectadas está controlado por un promotor diferente que el que regula el control de la expresión de la proteína detectable. A menudo se usan promotores constitutivamente activos, p. ej., el promotor PGK.

[00087] El uso de un segundo gen de selección no es ventajoso en absoluto para la capacidad de identificar los clones transfectados con éxito (la eficacia es relativamente baja). A parte de eso, puede existir una mayoría aplastante de células ES no transfectadas y, durante la diferenciación, p. ej., no se podrían detectar células positivas en EGFP.

[00088] En una realización adicional de la invención, las células se pueden manipular adicionalmente de forma que no se formen tejidos específicos. Esto puede suceder, por ejemplo, insertando elementos represores, p. ej., un elemento represor inducible con doxiciclina. De esta forma, se puede excluir una posible contaminación de células diferenciadas deseadas con células pluripotentes, potencialmente tumorigenas.

[00089] El tipo de célula deseado en el cual está previsto que se diferencien los citoblastos puede ser de cualquier tipo e incluye, pero no se limita a, células neuronales, células gliales, cardiomiocitos, células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a la glucosa, astrocitos, oligodendrocitos, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales de pigmento retinoico, fibroblastos, queratinocitos, células dendríticas, células de folículo piloso, células epiteliales de conductos renales, células endoteliales vasculares, células precursoras testiculares y células de músculo liso y esquelético; véase también anteriormente en el presente documento.

[00090] En una realización preferible concreta de la invención, dichas células diferenciadas *in vitro* son cardiomiocitos. Para esta realización, dicha secuencia reguladora específica para un tipo de célula es preferiblemente auriculo y/o ventriculo-específica. Las correspondientes secuencias reguladoras, es decir, promotores cardio-específicos, se describen en la técnica anterior; véase también anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, Nkx-2.5 específico para cardiomiocitos muy tempranos y células precursoras mesodérmicas, respectivamente (Lints y col., Development 119 (1993), 419-431); α -actina cardiaca humana específica para tejido cardiaco (Sartorelli y col., Genes Dev. 4 (1990), 1811-1822) y MLC-2V específico para células de músculo cardiaco ventricular (O'Brien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 90 (1993), 5157-5161; Lee y col., Mol. Cell. Biol. 14 (1994), 1220-1229; Franz y col., Circ Res. 73 (1993), 629-638 y documento WO96/16163). El promotor de cadena pesada de alfa-miosina cardio-específica se describe en los documentos Palermo y col., Cell. Mol. Biol. Res. 41 (1995), 501-519 y Gulick y col., J. Biol. Chem. 266 (1991), 9180-91855. La expresión de la cadena pesada de alfa-miosina cardio-específica AMHC1 y el establecimiento de polaridad anteroposterior en el desarrollo de corazón de pollo se describen en el documento Yutzey y col., Development 120 (1994), 871-883.

[00091] Otro tipo de células son fibroblastos, que también se puede generar *de novo* a partir de células ES según el procedimiento de la presente invención. Por tanto, las células ES se transfectan con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un marcador y, opcionalmente, un gen indicador operativamente relacionado con una secuencia reguladora específica para un tipo de célula, es decir, promotores específicos de fibroblastos tales como el promotor de colágeno $\alpha 2$ (I), que también es activo en células óseas; Lindahl y col., Biol. Chem. 277 (2002), 6153-6161; Zheng y col., Am. J. Pathol. 160 (2002), 1609-1617; Antoniv y col., J. Biol. Chem. 276 (2001), 21754-21764; véanse también los documentos Finer, y col., J. Biol. Chem. 262 (1987), 13323-13333; Bou-Gharios y col., J. Cell. Biol. 134 (1996), 1333-1344; Zheng y col., Am. J. Pathol. 160 (2002), 1609-1617; Metsaranta y col., J. Biol. Chem. 266 (1991), 16862-16869.

[00092] Un tipo adicional de célula son células endoteliales que pueden proceder de células ES transfectadas con una construcción de vector como se ha descrito de forma general anteriormente, en las que la secuencia reguladora específica para un tipo de célula es un promotor específico endotelial; véase, p. ej., el promotor vascular endotelial caderina descrito en el documento Gory y col., Blood 93(1999), 184-192; el promotor Tie-2, Schlaeger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 94 (1997), 3058-3063; el promotor Flk-1, Kappel y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 276 (2000), 1089-1099.

[00093] Se conocen promotores adicionales específicos para un tipo de célula y tejido; véase, p. ej., el fragmento del promotor de la cadena de colágeno pro-alfa-1 (II) (colágeno 2) específico para condrocitos descrito en el documento Zhou y col., J. Cell Sci. 108 (1995), 3677-3684; el promotor específico de alfa-1-tubulina neuronal descrito en el documento Gloster y col., J Neurosci 14 (1994); 7319-7330, y el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) descrito en el documento Besnard y col., J. Biol. Chem. 266 (1991), 18877-18883. Ejemplos adicionales de promotores específicos para un tejido son aquellos que son activos en células gliales, células hematopoyéticas, células neuronales, preferiblemente células neuronales embrionarias, células endoteliales, células cartilaginosas o células epidérmicas, así como células β secretoras de insulina. "Específico para un tejido" se debe considerar incluido en la expresión "específico para una célula".

[00094] Ejemplos adicionales de promotores específicos no cardíacos son: PECAM1, FLK-1 (endotelio), nestina (células precursoras neuronales), promotor de tirosina-hidroxilasa-1 (neuronas dopaminérgicas), α -actina de músculo liso, miosina de músculo liso (músculos lisos), α 1-fetoproteína (endodermo), promotor mínimo de cadena pesada de músculo liso (SMHC) (específico para músculos lisos), (Kallmeier y col., J. Biol. Chem. 270 (1995), 30949-30957).

[00095] La expresión promotor específico de desarrollo se refiere a promotores que son activos durante determinados momentos de tiempo durante el desarrollo. Ejemplos de tales promotores son el promotor β -MHC, que se expresa durante el desarrollo embrionario en el ventrículo de ratón y es sustituido por el promotor α -MHC en la fase prenatal. El NKx2.5, un promotor durante el desarrollo temprano del mesodermo/corazón, el factor natriurético auricular, un marcador del corazón embrionario temprano con la excepción de las marcapasos, que es regulado por disminución también en las últimas etapas de desarrollo, Flk-1, un promotor específico para endotelio que es activo durante la vasculogénesis temprana, el segmento del intrón 2 del gen de la nestina que se expresa en células precursoras neuronales (neuronas embrionarias y células gliales) y células gliales adultas (todavía parcialmente capaces de dividirse) (Lothian y Lendahl, Eur. J. Neurosci. 9 (1997), 452-462U).

[00096] Para las realizaciones descritas anteriormente en el presente documento dicho gen resistente y dicho gen indicador están, preferiblemente, contenidos en un vector bicistrónico y, preferiblemente, están separados por un IRES. Es especialmente preferible el uso de una construcción, en el que el gen resistente confiere resistencia a la puromicina, dicho marcador es la EGFP y dicho promotor es el promotor cardíaco α MHC; véanse también los Ejemplos.

[00097] Se sabe que cada tejido está constituido por un tipo de célula específica principal, que determina su papel funcional, junto con tipos de células de soporte (p. ej., fibroblastos, células estrómicadas, endoteliales, gliales, etc.), que pueden ser importantes para mantener la estructura arquitectónica tridimensional del tejido, su función trófica y las interconexiones con otros sistemas tisulares de todo el organismo. Por tanto, en una realización del procedimiento de la presente invención, una célula diferenciada *in vitro* de un tipo de célula se cultiva conjuntamente con al menos una célula de un segundo tipo de célula, y/o está comprendida en un tejido o estructuras de tipo tisular que comprenden al menos un segundo tipo de célula, tal como una cualquiera de las descritas anteriormente. Dicho segundo tipo de célula puede ser, por ejemplo, un segundo tipo de célula embrionaria. Preferiblemente, la célula diferenciada *in vitro* de dicho tejido o estructura tipo tisular se obtiene cultivando un embriocito indiferenciado (célula ES) derivado del primer tipo de célula en presencia de al menos un segundo tipo de célula embrionaria; y permitiendo la integración y alineación de dichos al menos dos tipos de células en dicho tejido o estructuras de tipo tisular. Dicho al menos un segundo tipo de célula también se puede generar como el primer tipo de célula, es decir, mediante diferenciación *in vitro* de células ES que han sido modificadas mediante ingeniería genética con los correspondientes genes marcadores; véase también anteriormente procedimientos y materiales apropiados. Un procedimiento correspondiente para proporcionar diversos tejidos o estructuras tipo tisular y células diferenciadas *in vitro* y tejidos similares se describe con detalle en la solicitud internacional WO2004/113515.

[00098] Por consiguiente, la expresión "célula diferenciada *in vitro*" también pretende incluir una pluralidad de células diferenciadas *in vitro* de tipos de células iguales o diferentes, así como tejido y órganos diferenciados *in vitro* y cultivos conjuntos de células diferenciadas *in vitro* con otros tipos de células tales como de origen embrionario. Por tanto, la expresión "célula diferenciada *in vitro*" no excluye necesariamente la presencia de una célula o tipo de célula diferente al citoblasto original a partir del cual se ha diferenciado. Sin embargo, en la mayoría de las realizaciones, es preferible el uso de un cultivo básicamente puro de células diferenciadas *in vitro* o el uso incluso de una única célula.

[00099] En una realización, en la que dicha célula diferenciada *in vitro* es un cardiomiocito, dicho al menos un segundo tipo de célula corresponde, preferiblemente, a una célula endotelial y/o fibroblasto. Por ejemplo, se ha tenido conocimiento de que la bradiquinina bloquea la hipertrofia inducida por angiotensina II en presencia de células endoteliales; véase Ritchie y col., Hypertension 31 (1998), 39-44. En dichos experimentos se han determinado los efectos de la bradiquinina en cardiomiocitos ventriculares aislados de corazones de ratas adultas y neonatales y el grado hasta el cual la bradiquinina bloquea la hipertrofia *in vitro*. Se descubrió que la bradiquinina es un agonista hipertrófico, como se define por la mayor síntesis proteica y secreción y expresión del péptido natriurético auricular.

Sin embargo, en cardiomiocitos cultivados conjuntamente con células endoteliales, la bradiquinina no aumentó la síntesis proteica. En conclusión, la bradiquinina tiene un efecto hipertrófico directo sobre los miocitos ventriculares. La presencia de células endoteliales es necesaria para los efectos antihipertróficos de la bradiquinina.

5 **[000100]** Por tanto, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad y del tipo de tejido u órganos enfermo sobre los que se va a investigar, se puede tener en cuenta el uso de cultivos simultáneos de células diferenciadas o tejido diferenciado *in vitro* en el procedimiento de la presente invención.

10 **[000101]** Como se mencionó anteriormente, la célula diferenciada *in vitro* que se va a ensayar se obtiene mediante un procedimiento que se realiza, preferiblemente, de forma que permita el auto-ensamblaje de los diferentes tipos de células, por ejemplo, en el tejido o estructura tipo tisular deseado que deberían asemejarse al tejido u órgano de un mamífero, preferiblemente humano, que se supone que se va a exponer a un compuesto determinado. Los citoblastos, en una realización preferible de la invención, están disponibles en forma de agregados que se conocen como cuerpos embrioides (EB). El documento WO02/051987 describe un protocolo para obtener cuerpos embrioides. La fabricación se realiza, preferiblemente, con el procedimiento de la "gota colgante" o mediante cultivo en metilcelulosa (Wobus y col., Differentiation 48 (1991), 172-182).

15 **[000102]** Por tanto, en una realización preferible concreta, el ensayo de tejido funcional de la presente invención se realiza con cuerpos embrioides (EB).

20 **[000103]** Como se mencionó anteriormente, los cuerpos embrioides representan un grupo complejo de células en diferenciación en diferentes tejidos. En una realización, las células dentro de un cuerpo embriode están básicamente sincronizadas para su diferenciación. Por consiguiente, a intervalos conocidos, la mayoría de las células sincronizadas se diferencian en las tres capas germinales embrionarias y se diferencian adicionalmente en múltiples tipos de tejidos, tales como cartílago, hueso, músculo liso y estriado y tejido neuronal, incluyendo ganglios embrionarios; véase también el documento Snodgrass y col., "Embryonic Stem Cells: Research and Clinical Potentials" Smith y Acher, eds. Peripheral Blood Stem Cells American Association of Blood Banks, Bethesda MD (1993). Por tanto, las células dentro de los cuerpos embrioides proporcionan un modelo mucho más cercano a la complejidad de los organismos completos que los ensayos tradicionales con levaduras o células únicas, evitando a la vez el coste y las dificultades asociadas con el uso de ratones y mamíferos más grandes. Además, la reciente disponibilidad de cuerpos embrioides humanos proporciona un vehículo incluso más cercano para establecer un modelo de toxicidad y para la identificación de fármacos útiles para el tratamiento de trastornos cardiacos en sistemas de órganos humanos y en seres humanos.

25 **[000104]** Alternativamente a lo anterior, se pueden usar matraces de agitación (cultivos en agitación) como procedimientos de cultivo. Por tanto, las células ES no diferenciadas se introducen en cultivos en agitación y se mezclan de forma permanente según un procedimiento establecido. Por tanto, se introducen 10 millones de células ES en 150 ml de medio con el 20% de FCS y se agitan de forma constante a una velocidad de 20 rpm, en la que la dirección del movimiento de agitación se cambia con regularidad. 24 horas después de la introducción de las células ES se añaden 100 ml adicionales de medio con suero y, después, se cambian 100-150 ml del medio cada día (Wartenberg y col., FASEB J. 15 (2001), 995-1005). En estas condiciones de cultivo se pueden obtener 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 por medio del gen resistente, bien todavía en el cultivo en agitación o bien después de ponerlas en placas, respectivamente.

30 **[000105]** Alternativamente a lo anterior, los EB diferenciados en la gota colgante podrían no ponerse en placas, sino simplemente mantenerse en suspensión. Incluso en estas condiciones, se podría observar experimentalmente la progresión de la diferenciación. La extracción de los tipos de células no deseados se puede realizar con un mezclado mecánico sólo y adición de baja concentración de enzima (p. ej., colagenasa, tripsina); se logra una suspensión de una única célula con una sencilla extracción de los tipos de células no deseados.

35 **[000106]** En una realización concreta preferible de la presente invención, los cuerpos embrioides se preparan según un sistema de "cultivo en masa" recientemente desarrollado usado en los ejemplos adjuntos y descritos con detalle en la solicitud internacional WO2005/005621.

40 **[000107]** En una realización preferible del procedimiento de la presente invención, la enfermedad de dicho fenotipo de enfermedad corresponde a una cardiopatía tal como una insuficiencia cardiaca o una cardiomiopatía. Lo más preferible, el fenotipo de enfermedad que se inducirá y evaluará es un fenotipo hipertrófico cardiaco; véanse también los Ejemplos.

45 **[000108]** La insuficiencia cardiaca es la incapacidad del corazón de suministrar suficiente sangre oxigenada para satisfacer las necesidades metabólicas de los tejidos y células de un sujeto. Esto puede ir acompañado de congestión circulatoria, tal como congestión de las venas sistémicas o pulmonares. Según se usa en el presente documento, la expresión insuficiencia cardiaca abarca una insuficiencia cardiaca debida a cualquier causa y

pretende abarcar, en el presente documento, expresiones tales como “insuficiencia cardiaca congestiva”, “insuficiencia cardiaca anterógrada”, “insuficiencia cardiaca por exceso de flujo cardiaco”, “insuficiencia cardiaca por falta de flujo cardiaco” y similares; véanse también los capítulos 13-17 del tratado de Braunwald para un análisis detallado. Afecciones que podrían conducir a una insuficiencia cardiaca incluyen, pero no se limitan a, arteriopatía coronaria, cardiomiopatía o cardiopatía congénita. Cardiomiopatía es cualquier enfermedad o disfunción del miocardio (músculo cardiaco) en la cual el corazón es anormalmente grande, grueso y/o rígido. Como resultado, la capacidad del músculo cardiaco de bombear sangre habitualmente disminuye. La enfermedad o trastorno puede ser, por ejemplo, inflamatorio, metabólico, tóxico, infiltrativo, fibroplástico, hematológico, genético o de origen desconocido. Hay dos tipos generales de cardiomiopatías: isquémica (resultante de la falta de oxígeno) y no isquémica. La cardiomiopatía isquémica es un trastorno crónico producido por una arteriopatía coronaria – una enfermedad en la que hay un estrechamiento u oclusión ateroscleróticos de las arterias coronarias sobre la superficie del corazón. La arteriopatía coronaria a menudo conduce a episodios de isquemia cardiaca, en la que el músculo cardiaco no recibe suministro de suficiente sangre rica en oxígeno. Eventualmente, el músculo cardiaco se hace más grande debido al trabajo adicional que debe hacer en ausencia de suficiente sangre rica en oxígeno.

[000109] La cardiomiopatía no isquémica generalmente se clasifica en tres grupos en base, principalmente, a características clínicas y patológicas:

(1) cardiomiopatía dilatada, un síndrome caracterizado por un agrandamiento del corazón y función sistólica de uno o ambos ventrículos dañada;

(2) cardiomiopatía hipertrófica, definida en el presente documento como (a) aumento global o local en el grosor de cualquiera de las paredes ventriculares o tabique interventricular, o (b) una mayor sensibilidad al aumento global o local del espesor de cualquiera de las paredes ventriculares o del tabique interventricular, tal como puede suceder en las enfermedades genéticas, hipertensión o disfunción de las válvulas cardiacas; o

(3) cardiomiopatías restrictivas e infiltrativas, un grupo de enfermedades en las que la característica clínica predominante generalmente es una capacidad dañada del corazón de relajarse (disfunción diastólica) y, a menudo, están caracterizadas por una infiltración del músculo cardiaco con sustancias extrañas tales como fibras amiloides, hierro o glicolípidos; véase también el documento Wynne y Braunwald, *The cardiomyopathies and myocarditides*, Braunwald y col., eds., *Harrison's principles of internal medicine*, 15ª ed. New York, McGraw-Hill (2001), 1359-1365.

[000110] Respecto al uso de cardiomiocitos como las células diferenciadas *in vitro* según el procedimiento de la presente invención, dicho fenotipo incluye preferiblemente un parámetro seleccionado del grupo constituido por tamaño celular, forma celular, síntesis proteica, organización del filamento de actina/miosina, activación del patrón de expresión génica característico de células cardiomiopáticas y/o activación de genes que se expresan durante el desarrollo embrionario temprano; véase también posteriormente.

[000111] Por supuesto, también se pueden evaluar según la presente invención otros tipos de células, tales como hepatocitos, para las cuales los parámetros adecuados para determinar cambios fenotípicos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el documento WO01/81549 describe la generación de células diferenciadas *in vitro* derivadas de citoblastos pluripotentes con características morfológicas de hepatocitos, que expresan marcadores de superficie característicos de hepatocitos y que tienen actividad enzimática y biosintética importante para la función hepática. Las células se pueden caracterizar según varios criterios fenotípicos. Los criterios incluyen, pero no se limitan a, la detección o cuantificación de los marcadores celulares expresados, y actividad enzimática, y la caracterización de características morfológicas y señalización intracelular. Las características son fácilmente apreciables por los expertos en la evaluación de las mismas e incluyen cualquiera o todos de los siguientes: una forma celular poligonal, un fenotipo binucleado, la presencia de retículo endoplasmático rugoso para la síntesis de proteína secretada, la presencia de un complejo Golgi-retículo endoplasmático-lisosoma para la clasificación de proteínas intracelulares, la presencia de peroxisomas y gránulos de glicógeno, mitocondrias relativamente abundantes y la capacidad de formar uniones intercelulares fuertes que producen la creación de espacios canaliculares biliares. Marcadores celulares útiles para distinguir células precursoras hepáticas, hepatocitos y epitelio biliar se muestran en la Tabla 1 del documento WO01/81549. Otros marcadores de interés incluyen los indicados como ejemplos en los Ejemplos 1, 2 y 6 de dicha solicitud internacional. Por ejemplo, también se puede medir la expresión del citocromo p450 a nivel proteico, por ejemplo, usando un anticuerpo específico mediante transferencia Western, o a nivel del ARNm, usando sondas y cebadores específicos mediante transferencia Northern o RT-PCR; véase el documento Borlakoglu y col., *Int. J. Biochem.* 25 (1993), 1659. También se pueden medir actividades concretas del sistema p450: actividad de la 7-etoxicumarina O-de-etilasa, actividad de la aloxirresorrufina O-de-alquilasa, actividad de la cumarina 7-hidroxisasa, actividad de la p-nitrofenol hidroxilasa, hidroxilación de la testosterona, actividad de la UDP-glucuroniltransferasa, actividad de la glutatión S-transferasa y otras; véase, p. ej., la revisión Gomes-Lechon y col. in “*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*” Academic Press (1997), 411-431.

[000112] Como ya se ha descrito anteriormente, el fenotipo de enfermedad se induce, preferiblemente, durante el cultivo de la célula diferenciada *in vitro*, puesto que el fenotipo de enfermedad puede ser mortal para el citoblasto usado para la diferenciación. Además, la posibilidad de inducir el fenotipo de enfermedad permite la investigación de si un compuesto determinado es capaz de evitar el inicio de una enfermedad si se añade antes de la inducción del fenotipo de enfermedad. Esta realización es especialmente útil para identificar y obtener fármacos que se puedan

usar como un medio profiláctico, lo cual es especialmente valioso considerar para la prevención de enfermedades cardiacas. Sin embargo, como se demuestra en el Ejemplo 2, también es posible y se prevé según la presente invención conferir el fenotipo de enfermedad de una forma constitutiva, por ejemplo, mediante expresión constitutiva de un gen relacionado con la enfermedad.

[000113] En una realización preferible, dicho fenotipo en el procedimiento de la presente invención se induce mediante cultivo de la célula diferenciada *in vitro* en presencia de un compuesto fisiológicamente activo. Como se demuestra en los Ejemplos 1 y 3, esto se puede realizar para cardiomiocitos con un agonista hipertrofico tal como, preferiblemente, la endotelina-1, angiotensina II o un agonista α 1-adrenérgico; lo más preferible, dicho agonista α 1-adrenérgico es fenilefrina.

[000114] Como se mencionó anteriormente y se describe en el Ejemplo 2, en otra realización, la célula diferenciada *in vitro* se modifica mediante ingeniería genética para mostrar dicho fenotipo. La modificación mediante ingeniería genética se puede realizar por diversos medios. Por ejemplo, la célula diferenciada *in vitro* se puede transducir usando procedimientos estándar conocidos en biología molecular para introducir una molécula de ácido nucleico de interés en la célula. En una realización, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido cuya expresión confiere el fenotipo de enfermedad. El polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico puede ser de la misma especie que las células (homólogo) o puede ser de una especie diferente (heterólogo). Además, el polipéptido puede corresponder bien a un tipo genéticamente intacto o bien a un alelo mutado, cualquiera de los cuales puede ser responsable del fenotipo de enfermedad. El polipéptido puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un enzima, una proteína estructural o regulador transcripcional.

[000115] Habitualmente, la secuencia de ácido nucleico de interés está operativamente relacionada con un elemento regulador, tal como un elemento regulador de la transcripción y/o la traducción; véase también anteriormente. Elementos reguladores incluyen elementos tales como un promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación, elementos reguladores de la estabilidad del ARNm y una señal de poliadenilación. Un promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Ejemplos específicos no limitativos de promotores incluyen el promotor del CMV, un promotor del factor natriurético auricular y promotores que incluyen un elemento sensible a la TET para la expresión inducible de un transgen. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico de interés se inserta en un vector, tal como un vector de expresión. Los procedimientos para preparar vectores de expresión son conocidos por los expertos en la materia y se pueden encontrar en el documento Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

[000116] Dicho fenotipo puede ser debido a expresión (en exceso) de un gen (mutado), silenciamiento de gen(es) (p. ej., mediante interferencia de ARN; ARNi), inactivación o activación de (un) gen(es) en dicha célula diferenciada *in vitro*.

[000117] En una realización, una célula diferenciada *in vitro* o las células ES subyacentes se pueden transfectar con una molécula de ácido nucleico diseñada para borrar funcionalmente o "inactivar" un gen de interés. En este procedimiento, la molécula de ácido nucleico de interés puede ser una molécula de ácido nucleico que es sometida a una recombinación homóloga y se inserta en el genoma de la célula. Los procedimientos para producir "inactivaciones" en células ES son conocidos por los expertos en la materia (véase, p. ej., la patente estadounidense nº 5.939.598). Según este ejemplo, las células se cultivan *in vitro* como se describe en el presente documento y se introduce un ácido nucleico exógeno en las células mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante transfección o electroporación. Las células cultivadas transfectadas se pueden entonces estudiar *in vitro*. Los procedimientos para la introducción de secuencias de ácido nucleico en citoblastos son conocidos en la técnica (p. ej., véase la patente estadounidense nº 6.110.743). Sin embargo, también es posible transfectar la célula diferenciada, usando, por ejemplo, transferencia génica adenovírica; véase, p. ej., el documento Larbig y col., *Circulation* 107 (2003), 485-489.

[000118] El calcio es fundamental en la regulación de la contractibilidad, crecimiento y expresión génica cardiacos. Las variaciones en la amplitud, frecuencia y compartimentación de las señales de calcio se descodifican mediante enzimas dependientes de calcio/calmodulina, canales iónicos y factores de transcripción. Los circuitos de señalización de calcio crean oportunidades para la modificación farmacológica de la función cardiaca y, por tanto, proporcionan una multitud de supuestos genes diana para uso en el procedimiento de la presente invención; véase para revisión, p. ej., el documento Frey y col., *Nature Med.* 6 (2000), 1221-1227.

[000119] La diversidad fenotípica en una cardiomiopatía hipertrofica y las rutas moleculares que producen la hipertrofia cardiaca y los factores que modifican estos procesos se analizan en el documento Arad y col., *Hum. Mol. Gen.* 11 (2002), 2499-2506, que describe que la cardiomiopatía hipertrofica (HCM), una vez considerada "idiopática", ahora se sabe que es el resultado de mutaciones dominantes en los genes que codifican las proteína del aparato contráctil, tales como mutaciones en genes que codifican la cadena pesada de la miosina cardiaca (β MHC), proteína C de unión a miosina cardiaca (MyBPC), troponina cardiaca T (TnT), troponina cardiaca I (TnI), α tropomiosina (α TM), cadenas ligeras esenciales y reguladoras y actina cardiaca. Estos genes pueden servir como parámetros que

se pueden evaluar respecto al fenotipo de enfermedad así como genes diana para inducir un fenotipo de enfermedad, en concreto, un fenotipo hipertrófico.

[000120] La genética de una cardiomiopatía dilatada, incluyendo la heterogeneidad de las características clínicas de la cardiomiopatía dilatada resultante de una única mutación genética, se describe en el documento Schönberger y col., Am. J. Hum. Genet. 69 (2001), 249-260. La tabla 1 del documento de Schönberger y col. proporciona una perspectiva general para locus de cardiomiopatía dilatada como el fenotipo predominante. Estos genes pueden servir como parámetros que se pueden evaluar respecto al fenotipo de enfermedad, así como genes diana para inducir un fenotipo de enfermedad, en concreto, un fenotipo de cardiomiopatía dilatada.

[000121] Un gen candidato concreto que se cree que es responsable de una cardiomiopatía es el fosfolamban; véase el documento McTiernan y col., J. Mol. Cell. Cardiol. 31 (1999), 679-692, para más información sobre la estructura y expresión del gen fosfolamban humano. El fosfolamban es un inhibidor endógeno de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplasmático y juega un papel fundamental en la contractibilidad y relajación cardíacas. Recientemente, se ha informado de que el fosfolamban humano anula las consecuencias de la cardiomiopatía dilatada mortal, revelando una diferencia crítica entre el ratón y el humano; véase el documento Haghghi y col., J. Clin. Invest. 111 (2003), 869-876. Por tanto, el fosfolamban se puede investigar adicionalmente usando el ensayo basado en células diferenciadas *in vitro* de la presente invención. Los medios y procedimientos para mediar la expresión o supresión del gen fosfolamban, así como mutaciones del mismo, son muy conocidos por los expertos en la materia; véase anteriormente y, por ejemplo, el documento Eizema y col., Circulation 101 (2000), 2193-2199, que informa sobre la expresión de sentido contrario del fosfolamban basada en adenovirus como un enfoque para mejorar la disfunción contráctil cardíaca y sobre la comparación de un promotor vírico constitutivo frente a uno cardíaco sensible a la endotelina-1. Además, se pueden usar genes, que se han considerado en el presente documento para la generación de modelos de animales transgénicos y para el tratamiento de enfermedades cardíacas. Por ejemplo, en la patente estadounidense nº 6.218.597 se describe un promotor de cadena pesada de alfa-miosina operativamente relacionado con una secuencia codificante que comprende ADN que codifica un receptor beta-1-adrenérgico. Se han usado la expresión en exceso de las Gs-alfa y antagonistas del receptor beta-adrenérgico para establecer un modelo de animal transgénico de insuficiencia cardíaca en la solicitud internacional WO97/36477.

[000122] Además, en la solicitud de patente alemana nº 19815128 se describen una casete de expresión específica de músculo cardíaco que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un inductor de cardiomiopatía humano bajo el control de una secuencia reguladora específica para el miocardio.

[000123] Se ha descrito el uso de una región codificante que codifica calcineurina, cinasa IV dependiente de calcio/calmodulina (CaMKIV), o un fragmento funcional de la calcineurina o CaMKIV, operativamente relacionadas con un promotor, que es preferiblemente activo en cardiomiocitos, para producir hipertrofia cardíaca en ratones transgénicos; véanse la patente estadounidense nº 6.657.104 y el Ejemplo 2. Además, los genes que se expresan diferencialmente en tejido cardíaco hipertrófico en comparación con tejido cardíaco normal se han descrito en la solicitud de patente estadounidense US2003/148296. Se describe un panel de genes que se expresan diferencialmente en estados de hipertrofia cardíaca, que se han clasificado como hipertrofia cardíaca "buena" (inducida por ejercicio) e hipertrofia cardíaca "mala" (inducida por hipertensión); véase, p. ej., la tabla 2 para 20 genes marcadores de hipertrofia cardíaca. En la solicitud internacional WO99/24571 se describen genes marcadores de hipertrofia cardíaca adicionales.

[000124] En una realización preferible del procedimiento de la presente invención, dicha célula diferenciada *in vitro* expresa (en exceso) un polipéptido seleccionado del grupo constituido por troponina (mutada), cadena pesada de miosina, calcineurina, calmodulina, proteína cinasa C, fosfolamban o cinasa IV dependiente de calcio/calmodulina (CaMKIV).

[000125] Otro ejemplo es proporcionado por las mutaciones de Andersen del KCNJ2, que suprime la IK1 de la corriente rectificadora de entrada nativa de una forma dominante negativa. El síndrome de Andersen es una enfermedad hereditaria que está caracterizada por arritmias cardíacas, parálisis periódicas y características dismórficas. Las mutaciones del gen KCNJ2, que codifica la subunidad del canal de potasio rectificador de entrada Kir2.1, se han identificado en individuos afectados. Expresando la mutación KCNJ2-S 136F de la enfermedad en cardiomiocitos de rata neonatal usando transferencia de genes adenovíricos se pudo demostrar que la densidad de la I(K1) ciertamente disminuía significativamente en células infectadas con KCNJ2-S136F y que la supresión dominante negativa de la I(K1) en células nativas es la correlación patofisiológica del síndrome de Andersen; véase el documento Lange y col., Cardiovasc. Res. 59 (2003), 321-327.

[000126] Además, también es posible usar el sistema de ensayo de la presente invención para investigar potenciales genes diana de fármacos. Por ejemplo, según la presente invención, los citoblastos se pueden transfectar con un vector plásmido que comprende una secuencia de ADNc de un gen que se ha identificado en contexto con su expresión diferencial en una célula, tejido u órgano enfermos. Tras la diferenciación, se induce la

expresión del gen diana y el fenotipo resultante se analiza en comparación con una muestra de control, la cual bien no expresa el gen diana o bien expresa el gen diana a un nivel normal. Si la inducción de la expresión de genes diana produce un fenotipo de enfermedad, p. ej., un fenotipo de enfermedad mejorado, esto se puede considerar una prueba de que el gen diana es responsable, o al menos está implicado en el desarrollo de la enfermedad, y, por tanto, se puede centrar la atención en el mismo para una intervención terapéutica. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, dicha célula diferenciada *in vitro* se modifica mediante ingeniería genética para expresar o suprimir un gen que codifica una potencial diana de un fármaco; véase también posteriormente.

[000127] Como ya se ha mencionado para las realizaciones que comprenden el uso de agentes fisiológicamente activos para la inducción del fenotipo de enfermedad, es igualmente preferible que, en células diferenciadas *in vitro*, que se han modificado mediante ingeniería genética para mostrar el fenotipo de enfermedad, dicho fenotipo sea inducible, por ejemplo, expresando el gen responsable de dicho fenotipo bajo el control de un promotor inducible. Los sistemas de promotores inducibles son conocidos por los expertos en la materia; véase también anteriormente. Los promotores usados son, preferiblemente, inducibles y útiles en las condiciones apropiadas para dirigirse a genes diana con alto nivel de expresión. El uso de un promotor inducible en la presente invención proporciona un activador molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótidos operativamente relacionada cuando se desea tal expresión o de desactivar la expresión cuando la expresión no se desea. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotioneína, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina. Existen diversos sistemas de vectores de expresión que se pueden emplear para uso en la presente invención. Por ejemplo, el sistema Complete Control™ de Stratagene se refiere a un sistema de expresión inducible en mamíferos, que implica un promotor inducible de ecdisona sintética. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible en Invitrogen, que incluye el sistema T-REX™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión inducible en mamíferos que usa el promotor de CMV de cadena completa. El sistema inducible con tetraciclina para la regulación de la expresión de genes en ratones transgénicos se describe en el documento Grill y col., Transgenic Res. 12 (2003), 33-43. Además, la expresión de genes regulada por tetraciclina en vectores del virus del herpes simple incapaces de replicarse se describe en el documento Schmeisser y col., Hum. Gene Ther. 13 (2002), 2113-2124. Además, la rápida generación de un retrovirus defectuoso en BCR-ABL inducible con tetraciclina usando un único casete retroviral autorregulador se proporciona en documento Dugray y col., Leukemia 15 (2001), 1658-1662. El uso del silenciador transcripcional controlado con tetraciclina (TTS) para eliminar la fuga de transgenes en ratones transgénicos con expresión en exceso inducible se describe en el documento Zhu y col., J. Biol. Chem. 276 (2001), 25222-25229. El sistema Tet-On en ratones transgénicos para la inhibición de la actividad del gen pdx-1 en el ratón mediante la expresión del ARN de sentido contrario en células beta pancreáticas se expone en el documento Lottmann y col., J. Mol. Med. 79 (2001), 321-328. Para la expresión de genes inducible con doxiciclina véanse, p. ej., los documentos Lindeberg y col., J. Neurosci. Res. 68 (2002), 248-253, y Kim y col., Am. J. Pathol. 162 (2003), 1693-1707. Además, el uso de la expresión de genes controlada por doxiciclina para modificar reversiblemente la composición de la proteína láctea en ratones transgénicos se describe en el documento Soulier y col., Eur. J. Biochem. 260 (1999), 533-539. Todos los sistemas de expresión inducible se pueden usar con los vectores y procedimientos de la presente invención.

[000128] Además, se debe sobreentender, por supuesto, que el gen responsable de dicho fenotipo puede ser un gen, por ejemplo ADNc que codifica un ARN, que puede ser funcional en sí mismo, tal como el ARN ribosómico, o puede codificar el polipéptido funcional que es responsable de dicho fenotipo. Alternativamente, el gen responsable de la inducción de dicho fenotipo es capaz de mediar la supresión a un gen diana endógeno o inhibir la actividad del producto codificado por dicho gen diana. En este caso, la falta de expresión del gen diana y actividad de su producto génico serían responsables del fenotipo de enfermedad. Se debe sobreentender también que el gen diana que se va a expresar o suprimir puede ser un alelo sin modificar o mutado. Los medios y procedimientos para conferir expresión o supresión de un gen son muy conocidos por los expertos en la materia; véase también anteriormente.

[000129] Para investigar el efecto profiláctico de un compuesto de ensayo es preferible inducir el fenotipo de enfermedad sólo después de que el compuesto de ensayo se haya añadido al medio de cultivo o inyectado en la célula; véase también anteriormente. Por otra parte, si se pretende determinar el efecto terapéutico y curativo de un supuesto fármaco sobre una enfermedad que ya se ha establecido, también se puede inducir un fenotipo de enfermedad antes de que el compuesto de ensayo se haya añadido y, a continuación, monitorizar la progresión de la enfermedad en presencia y ausencia del compuesto de ensayo, respectivamente.

[000130] En una realización adicional, dicho procedimiento se realiza sobre una matriz. Matrices útiles para uso en el ensayo de la presente invención habitualmente comprende un soporte sólido y, fijadas al mismo o suspendidas en el mismo, las células diferenciadas *in vitro*. El uso de matrices de microelectrodos planos para células y agregados celulares cultivados como biosensores es de especial interés. Tales matrices generalmente consisten en un sustrato de vidrio, plástico o silicio sobre el cual se deposita un conductor, p. ej., oro, platino, óxido de indio-estaño, iridio, etc., sobre el que se transfiere un patrón. Sobre los electrodos conductores e interconexiones se deposita una capa aislante, p. ej., material fotorresistente, poliimida, dióxido de silicio, nitruro de silicio, etc. y, a

continuación, se retira de regiones de los electrodos para definir los lugares de registro. Las células se cultivan directamente sobre esta superficie y entran en contacto con el conductor expuesto en los lugares de registro sin aislante. Dependiendo del tamaño de los electrodos y de las células, los registros de la actividad eléctrica pueden ser de una única célula o de poblaciones de células, incluyendo agregados celulares. Cada lugar del electrodo generalmente está conectado a la entrada de un amplificador de elevada impedancia de entrada y bajo ruido, con o sin capacitores de acoplamiento AC, para permitir la amplificación de las señales extracelulares relativamente pequeñas. Ejemplos de biosensores se describen en los documentos Novak y col. IEEE Transactions on Biomedical Engineering BME-33(2) (1986), 196-202; Drodge y col., J. Neuroscience Methods 6 (1986), 1583-1592; Eggers y col., Vac. Sci. Technol. B8(6) (1990), 1392-1398; Martinoia y col., J. Neuroscience Methods 48 (1993), 115-121; Maeda y col., J. Neuroscience 15 (1995), 6834-6845; y Mohr y col. Sensors and Actuators B-Chemical 34 (1996), 265-269.

[000131] En la realización, el procedimiento de la presente invención se realiza preferiblemente con una matriz de multi o micro-electrodos (MEA), tal como los mencionados anteriormente. Este sistema de ensayo de la presente invención es una alternativa especialmente ventajosa al ensayo en animales de análisis del efecto cardiaco, que generalmente requieren mucho tiempo y son caros. Por tanto, el sistema de ensayo de tejido funcional es especialmente útil para el desarrollo de fármacos y ensayo de la toxicidad de cualquier compuesto con el cual pueda entrar en contacto un humano o animal. Las matrices de microelectrodos (MEA) son dispositivos que permiten el registro extracelular múltiple de la generación y propagación del potencial de acción dentro de, por ejemplo, cardiomiocitos derivados de células ES. Estos registros se asemejan a los muy conocidos ECG usados por los médicos. La matriz de las MEA habitualmente consiste en 60 electrodos de oro integrados en la parte inferior de un dispositivo de cultivo de células especialmente diseñado. Los cuerpos embrioides (EB) derivados de células ES se pueden cultivar en tales dispositivos. Tras la fijación y propagación sobre la superficie, las células de los EB que contienen cardiomiocitos entran en contacto con los electrodos. Todos los potenciales de acción extracelulares de salida se pueden registrar al mismo tiempo durante experimentos de observación tanto de corta como de larga duración. Los posteriores análisis de frecuencias y latencias con un programa apropiado permiten revelar el "mapa eléctrico" fino de los clústeres latentes.

[000132] Por ejemplo, se puede realizar un seguimiento de propiedades electrofisiológicas antes, durante y después de la adición del compuesto de ensayo a los miocitos cardiacos mediante los registros de los potenciales de campo extracelulares con matrices de microelectrodos (MEA) constituidas por, p. ej., 60 electrodos integrados en el sustrato; véase el documento Banach y col. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 284 (2003), H2114-2123. Se usaron múltiples matrices de microelectrodos de tungsteno para registrar las respuestas simultáneas de neurocitoblastos cerebrales que contribuyen a la generación del patrón motor respiratorio; véase el documento Morris y col., Respir. Physiol. 121 (2000), 119-133.

[000133] Los parámetros anteriormente mencionados se pueden usar en los sistemas de ensayo basados en células de la presente invención junto con uno cualquiera de dichos parámetros además de la medición de la actividad eléctrica de dicho material biológico a través de dicha matriz de electrodos.

[000134] Preferiblemente, los cuerpos embrioides se usan en los ensayos de la presente invención para ensayar la composición química; véase también posteriormente. La elección de la especie concreta de la cual procede el cuerpo embriode típicamente reflejará un equilibrio de diversos factores. En primer lugar, dependiendo del propósito del estudio, pueden ser de especial interés una o más especies. Por ejemplo, los cuerpos embrioides humanos serán de especial interés para uso con composiciones que se van a ensayar como potencial sustancia terapéutica para humanos, pero también para ensayos toxicológicos para sustancias que incluyen productos químicos industriales, mientras que cuerpos embrioides equinos, felinos, bovinos, porcinos, caprinos, caninos u ovinos pueden ser de mayor interés para una potencial sustancia terapéutica para uso veterinario. También son preferibles cuerpos embrioides de otras especies habitualmente usadas en ensayos preclínicos, tales como cobayas, ratones, rata, conejos, cerdos y perros. Típicamente, los cuerpos embrioides de estas especies se usarán para el "primer pase" del cribado, o cuando no se necesaria información detallada sobre toxicidad en seres humanos, o cuando un resultado en un murino u otra de estas especies de laboratorio se ha correlacionado con un efecto conocido tóxico o de otro tipo en seres humanos. Además, con respecto a los productos terapéuticos para uso humano, las agencias de regulación generalmente exigen datos en animales antes de comenzar los ensayos en seres humanos; generalmente será deseable usar cuerpos embrioides de las especies que se usarán en los estudios preclínicos en animales. Los resultados de los ensayos en cuerpos embrioides pueden entonces guiar al investigador sobre el grado y tipo de toxicidad a esperar durante los ensayos en animales. Determinadas especies de animales son conocidas en la materia por ser mejores modelos de toxicidad de diferentes tipos en seres humanos que otros y las especies también difieren en su capacidad de metabolizar fármacos; véanse, p. ej., los documentos Williams, Environ. Health Perspect. 22 (1978), 133-138; Duncan, Adv. Sci. 23 (1967), 537-541. Por tanto, las especies concretas preferibles para uso en un estudio preclínico de toxicidad concreto pueden variar según el uso previsto del candidato a fármaco. Por ejemplo, una especie que proporciona un modelo adecuado para un fármaco previsto para tener efecto sobre el sistema reproductor puede no ser adecuada como modelo para un fármaco previsto para tener efecto sobre el sistema nervioso. Los criterios para seleccionar la especie apropiada

para el ensayo preclínico son muy conocidos en la técnica.

[000135] Cuando se ha iniciado un cultivo de cuerpos embrioides, se puede poner en contacto con una composición química. Convenientemente, la composición química está en una disolución acuosa, preferiblemente en un disolvente convencionalmente usado en cultivos celulares, por ejemplo, DMSO, y se introduce en el medio de cultivo; véanse también los ejemplos. La introducción se puede realizar mediante cualquier medio conveniente, pero habitualmente mediante una pipeta, micro-pipeteador o una jeringa. En algunas aplicaciones, tales como cribado de elevada productividad, las composiciones químicas se introducirán mediante medios automáticos, tales como sistemas de pipeteado automáticos, que pueden estar en brazos robóticos. Las composiciones químicas también se pueden introducir en el medio en forma de líquido o de polvo, con o sin excipientes farmacéuticos, ligantes y otros materiales habitualmente usados en composiciones farmacéuticas, o con otros vehículos que se podrían emplear para el uso previsto. Por ejemplo, las composiciones químicas previstas para uso como productos químicos agrícolas o como agentes petroquímicos se pueden introducir en el medio como tales para ensayar la toxicidad de dichos productos químicos y agentes o introducir en combinación con otros materiales que se podrían usar o que se podrían encontrar en el entorno, para determinar si la combinación de los productos químicos o agentes tienen un efecto sinérgico. Típicamente, los cultivos se agitarán, al menos un poco, antes de la introducción de una composición química para garantizar que la composición se dispersa por todo el medio.

[000136] El momento en el cual se añade una composición química al cultivo es a criterio del profesional y variará según el objetivo concreto del estudio. Convenientemente, la composición química se añadirá tan pronto como el cuerpo embrioide se haya desarrollado a partir de los citoblastos, permitiendo la determinación de la alteración en la expresión de los genes o proteínas en el desarrollo de todos los tejidos del cuerpo embrioide. Sin embargo, puede ser de interés centrar el estudio en el efecto de la composición sobre un tipo concreto de tejido. Como se ha indicado anteriormente, se sabe que los tejidos individuales, tales como tejido muscular, nervioso y hepático, se desarrollan en momentos de tiempo específicos después de que se haya formado el cuerpo embrioide. Por tanto, la adición de la composición química se puede organizar para que se produzca en el momento en que el tejido de interés comience a desarrollarse, o en un momento elegido después del comienzo de dicho desarrollo, para observar el efecto de la expresión de genes o proteínas en el tejido de interés.

[000137] Se usarán diferentes cantidades de una composición química que entrará en contacto con el cuerpo embrioide dependiendo de la cantidad de información conocida sobre la toxicidad de dicha composición, los propósitos del estudio, el tiempo disponible y los recursos del profesional. Se puede administrar una composición química justo en una concentración, especialmente cuando otros estudios o trabajos pasados o experiencia en el campo con el compuesto hayan indicado que una concentración concreta sea la más habitualmente hallada en el cuerpo. Más habitualmente, la composición química se añadirá en diferentes concentraciones a cultivos de cuerpos embrioides realizados simultáneamente, de forma que se puedan evaluar los efectos de las diferencias de concentración en la expresión de genes o proteínas y, por tanto, las diferencias en la toxicidad de la composición para diferentes concentraciones. Típicamente, por ejemplo, la composición química se añadirá en una concentración normal o media, y agruparlas en aumentos o disminuciones del doble o el quintuple de la concentración, dependiendo del grado de precisión deseado.

[000138] Cuando la composición es de toxicidad desconocida, es conveniente realizar primero un estudio preliminar para determinar los intervalos de concentración a los cuales se ensayará la concentración. Se conocen diversos procedimientos para determinar las dosis de concentración en la técnica. Un procedimiento habitual, por ejemplo, es determinar la dosis a la cual el agente es directamente tóxico. El profesional disminuye entonces la dosis a la mitad y realiza un estudio de dosificación, típicamente administrando el agente de interés en diluciones del quintuple o el doble de concentración en cultivos simultáneos de células del tipo de interés. Para contaminantes ambientales, la composición habitualmente se ensayará también a la concentración a la cual se encuentra en el entorno. Para productos químicos agrícolas, tales como pesticidas que dejan residuos en los alimentos, el agente habitualmente se ensayará a la concentración a la cual se encuentra el residuo, aunque probablemente se ensayará también a otras concentraciones. Por tanto, la dilución de los compuestos de ensayo se puede llevar a cabo realizando, en tubos independientes, una serie de diluciones de los compuestos concentrados de 50 ó 100 veces en DMSO. Se distribuyen en cada pocillo uno o dos μl de cada dilución antes de la distribución de la suspensión de células.

[000139] Las consideraciones anteriores respecto a la puesta en contacto de los compuestos con los cuerpos embrioides, momento de contacto, etc., también se aplican a los ensayos de la invención realizados en, p. ej., células ES, tejido y animales no humanos, si es aplicable.

[000140] Según el sistema de ensayo de la presente invención, preferiblemente se analizan uno o todos de los parámetros siguientes:

- (i) canales de Na^+ ;
- (ii) canales de $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$;
- (iii) canales de K^+ ;

- (iv) amplitud y/o duración del potencial de campo (FDP);
- (v) cronotropismo de células cardíacas o periodos de ráfagas de células neuronales;
- (vi) arritmias, fenómenos tipo EAD;
- (vii) valor de pH;
- 5 (viii) presión parcial de oxígeno (pO₂);
- (ix) detención del latido; y
- (x) análisis de contractibilidad con disociación AV, SIN efectos y/o cambios morfológicos.

10 **[000141]** Las MEA y los procedimientos para su uso en análisis de células biológicas son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la solicitud internacional WO97/05922 describe una disposición de microelectrodos para filtrar, con resolución local, potenciales celulares eléctricos, o para estimulación eléctrica de redes de células biológicas tales como, por ejemplo, cultivos celulares, secciones tisulares “*in vitro*” o tejidos biológicos “*in vivo*”. Se puede usar un dispositivo de micro-elementos, tal como el descrito en la solicitud internacional WO98/22819, que tiene una pluralidad de micro-elementos, que pueden estar configurados como

15 micro-electrodos, dispuestos sobre un sustrato y adaptados para entrar en contacto con las células presentes en un entorno líquido. Las células se guían hasta los microelectrodos, se aíslan o se atraen mecánicamente hasta los microelectrodos. Se puede aplicar a las células una fuerza de presión negativa o una fuerza hidrodinámica. Además, el uso de una matriz de electrodos, como se describe en la solicitud internacional WO01/65251, se puede adaptar según las enseñanzas de la presente invención.

20 **[000142]** Para el análisis de los datos de los multielectrodos se pueden usar diversas herramientas disponibles en la técnica anterior; véanse, por ejemplo, los documentos Egert y col., “MEA-tools: An open source toolbox for the analysis of multielectrode data with MATLAB. *J. Neuroscience Methods* 117 (2002), 33-42, y Banach y col., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (2003), H2114-2123).

25 **[000143]** En una realización preferible, la muestra de ensayo comprende cuerpos embrioides (EB) diferenciados en cardiomiocitos, lo más preferible EB que consisten en tejido cardíaco funcional que late de forma autónoma y abarca las propiedades electrofisiológicas de cardiomiocitos auriculares y ventriculares, así como de células marcapaso.

30 **[000144]** Los procedimientos y ensayos descritos en el presente documento pueden sustituir diversos modelos en animales y forman nuevos ensayos basados en mamíferos y biosensores para ambientes extremos. En concreto, los procedimientos de la invención también se pueden usar para ensayos toxicológicos, mutagénicos y/o teratogénicos *in vitro*. Esto es debido a que la gente que padece una enfermedad es más vulnerable a una intoxicación y sensible a los efectos secundarios de los productos farmacéuticos, productos nutricionales y otros compuestos con los que entran en contacto. Puesto que las células y tejido obtenidos según la presente invención se asemejan mucho más a la situación *in vivo*, se espera que los resultados obtenidos mediante los ensayos toxicológicos de la presente invención también se correlacionen con la toxicidad *in vivo* de los compuestos ensayados. En una realización especialmente ventajosa de la presente invención, los ensayos anteriormente

35 descritos se usan como un sistema alternativo a los ensayos en animales de los efectos cardíacos de los compuestos, que requieren mucho tiempo y son caros. Esta realización se basa en “cardiocuerpos”, es decir, cuerpos embrioides (EB) diferenciados en cardiomiocitos, preferiblemente los descritos en la solicitud internacional WO2005/005621. Los cardiocuerpos proceden, preferiblemente, de embriocitos indiferenciados de ratón o rata. Los cardiocuerpos consisten en tejido cardíaco funcional que late de forma autónoma y abarca las propiedades electrofisiológicas de cardiomiocitos auriculares y ventriculares, así como de células marcapaso.

40 **[000145]** En una realización preferible concreta, se usan células ES de la línea celular de ratón R1 (Nagy y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993), 8424-8428, disponible en la ATCC con nº de acceso SCRC-1011) o una línea derivada de la misma en los ensayos de la presente invención; véase también el Ejemplo 2.

45 **[000146]** En una realización, los cardiocuerpos se colocan en placas sobre un sistema de matriz multielectrodos (MEA, MultiChannel Systems, Reutlingen, Alemania). Los registros de potenciales de campo extracelulares con matrices de micro-electrodos constituidas por 60 electrodos integrados en el sustrato se pueden realizar como se describe, por ejemplo, en el documento Banach y col., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (2003), H2114-2123.

50 Los registros extracelulares del potencial de campo reflejan los cambios electrofisiológicos durante la excitación de los cardiomiocitos en los cardiocuerpos. En una realización concreta preferible, se realiza un análisis automático usando el software AxioTools desarrollado por AxioGenesis AG, Colonia, Alemania.

55 **[000147]** En una realización concreta preferible, la presente invención se refiere a un procedimiento para cribar una sustancia respecto a la capacidad de mejorar una cardiomiopatía, que comprende:

60 (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende un cardiomiocito diferenciado *in vitro* como se describió anteriormente con una sustancia de ensayo antes, durante o después de que en dicha célula se induzca la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula, tejido u órgano enfermos;

(b) medir un parámetro cardiomiopático en el cardiomiocito de la etapa (a);
 (c) comparar la medición obtenida en la etapa (b) con la de un cardiomiocito no sometido a la sustancia;
 en el que la medición del parámetro del cardiomiocito en los cardiomiocitos de la etapa (a) es coherente con una
 reducción de la hipertrofia cardíaca.

[000148] La caracterización de cardiomiocitos se puede realizar con diversos parámetros conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las células se pueden caracterizar según varios criterios fenotípicos. Los cardiomiocitos a menudo tienen características morfológicas, por ejemplo, pueden tener forma de huso, redonda, triangular o multiangular, con estriaciones características de estructuras sarcoméricas detectables mediante inmunotinción; véase también la Figura 2. Pueden formar estructuras tipo miotubo y mostrar los típicos sarcómeros y gránulos auriculares cuando se examinan mediante microscopía electrónica.

[000149] En las circunstancias apropiadas, los cardiomiocitos derivados de citoblastos a menudo muestran actividad contráctil periódica espontánea. Esto significa que, cuando se cultivan en un entorno de cultivo tisular adecuado con una concentración apropiada de Ca^{2+} y equilibrio de electrolitos, se puede observar cómo se contraen las células a lo largo de un eje de la célula y, a continuación, relajan su contracción, sin tener que añadir ningún componente adicional al medio de cultivo. Las contracciones son periódicas, lo que significa que se repiten regular o irregularmente, con una frecuencia de entre 6 y 200 contracciones por minuto y, a menudo, entre 20 y 90 contracciones por minuto. Las células individuales pueden mostrar actividad contráctil periódica espontánea por sí mismas o pueden mostrar actividad contráctil periódica espontánea conjuntamente con las células vecinas en un tejido, agregado celular o masa celular en cultivo.

[000150] La actividad contráctil de las células se puede caracterizar según la influencia de las condiciones de cultivo en la naturaleza y frecuencia de las contracciones. Los compuestos que disminuyen la concentración de Ca^{2+} disponible o interfieren de alguna otra forma con el transporte transmembrana de Ca^{2+} a menudo afectan a la actividad contráctil. Por ejemplo, el bloqueador del canal de calcio tipo L diltiazem inhibe la actividad contráctil de una forma dependiente de la dosis.

[000151] Por otra parte, los agonistas de adrenorreceptores, como isoprenalina y fenilefrina, tienen un efecto cronotrópico positivo. Una caracterización adicional de las propiedades funcionales de la célula puede implicar caracterizar los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Se puede estudiar la electrofisiología mediante análisis de control en parche para potenciales de acción tipo cardiomiocitos; véanse los documentos Igelmund y col., Pflugers Arch. 437 (1999), 669; Wobus y col., Ann. N. Y. Acad. Sci. 27 (1995), 752; y Doevendans y col., J. Mol. Cell Cardiol. 32 (2000), 839.

[000152] El parámetro cardiomiopático puede ser cualquiera de los descritos anteriormente en el presente documento y, preferiblemente, es la expresión de un gen o actividad de un producto génico seleccionado del grupo constituido por un gen del factor natriurético auricular, un gen del péptido natriurético de tipo b, un gen de cadena pesada de β -miosina, un gen de actina α -esquelética, c-FOS, c-JUN, c-MYC, genes de respuesta a crecimiento temprano, proteína 70 de choque térmico, cadena pesada de alfa-miosina, colágeno III, preproendotelina-1, cadena 2 ligera de miosina, intercambiador de Na^+/H^+ , alfa-actina cardíaca, intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, receptor de fosfatidilinositol-3, enzima convertidora de angiotensina, colágeno I, colágeno XV, Ca-ATPasa-2 alfa del retículo sarcoplasmático, beta-adrenorreceptor, proteína cinasa C y fosfolamban.

[000153] En una realización, se puede ensayar un producto terapéutico de la invención respecto a su actividad en el tratamiento o prevención de hipertrofia cardíaca poniendo en contacto las células cultivadas que exhiben un indicador de una enfermedad hipertrófica cardíaca *in vitro* con el producto terapéutico; y comparando el nivel de dicho indicador en las células puestas en contacto con el producto terapéutico con dicho nivel de dicho indicador en células que no han estado en contacto, en el que un nivel alterado de tales indicadores en dichas células en contacto indica que el producto terapéutico tiene actividad en el tratamiento o prevención de la enfermedad hipertrófica cardíaca. Ejemplos específicos de tales indicadores de hipertrofia cardíaca incluyen, pero no se limitan a: mayor tamaño de células miocárdicas (Simpson y col., J. Clin. Invest. 72 (1983), 732-738), aumento del ensamblaje de una proteína contráctil individual (MLC-2) en unidades contráctiles organizadas (Iwaki y col., J. Biol. Chem. 265 (1990), 13809-13817), acumulación de proteínas contráctiles (Lee y col., J. Biol. Chem. 263 (1988), 7352-7358), mayor contenido en proteínas por célula (Lai y col., Am. J. Physiol. 271 (1996), H1197-H2208), activación del gen [beta]-MHC y represión del gen [alfa]-MHC (Lompré y col., Int. Rev. Cytol. 124 (1991), 137-186), regulación por aumento transitorio del gen de isoactina [alfa]-esquelético (Izumo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 85 (1988), 339-343); reactivación permanente de la isoforma de la actina [alfa]-lisa (Black y col., J. Clin. Invest. 88 (1991), 1581-1588), mayor expresión de las cadenas ligeras de miosina 1 y 2 (Cummins, Biochem. J. 205 (1982), 195-204), activación transitoria de la isoforma [beta] de la tropomiosina (Izumo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 85 (1988), 339-343), mayor expresión de isoenzimas tipo fetal (BB+MB) de creatinina cinasa y de la isoforma M-LDH de la lactato deshidrogenasa (Ingwall y col., N. Engl. J. Med. 313 (1985), 1050-1054), acumulación de formas fetales de fibronectina celular en la pared de las arterias coronarias y en áreas localizadas del miocardio poco después de una estenosis aórtica en ratas (Samuel y col., J. Clin. Invest. 88 (1991), 1737-1746), regulación por aumento transitorio

de c-fos, c-myc, c-jun, junB y nur 77 (Komuro y col., *Circ. Res.* 62 (1988), 1075-1079; Izumo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 85 (1988), 339-343; Rockman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 88 (1991), 8277-8281), expresión transitoria y temprana de tres proteínas de choque térmico (HSP70, HSP68 y HSP58) (Delcayre y col., *J. Clin. Invest.* 82 (1988), 460-468), acumulación de factor de crecimiento transformante [beta]1 (TGF[beta]1) codificante de ARNm, factor de crecimiento I tipo insulina y factor de respuesta de crecimiento temprano 1 (Egr-1), una proteína dedo de cinc inducible con suero (Schneider y Parker, *Mol. Biol. Med.* 8 (1991), 167-183; Chien y col., *FASEB J.* 5 (1991), 3037-3046), la expresión ventricular del factor natriurético auricular (ANF) (Mercadier y Michael, en Swynghedauw B, ed. *Research in Cardiac Hypertrophy and Failure*. Paris, INSERM/John Libbey Eurotext (1990), 401-413) y menor expresión de la isoforma SERCA2a en forma cardiaca/esquelética lenta de la ATPasa de Ca del retículo sarcoplásmático (Komuro y col., *J. Clin. Invest.* 83 (1989), 1102-1108; Nagai y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 86 (1989), 2966-2970; De la Bastie y col., *Circ. Res.* 66 (1990), 554-564; Mercadier y col., *J. Clin. Invest.* 85 (1990), 305-309).

[000154] Las ventajas de esta realización concreta de ensayos de cribado de la presente invención, respecto a los ensayos *in vitro* convencionales, incluyen

- Modelo de cultivo celular muy estandarizado, producción homogénea y reproducible de CardioCuerpos;
- Presencia de células auriculares, ventriculares y marcapaso con comportamiento fisiológico normal (p. ej., expresión y regulación de canales iónicos);
- Cribado tipo ECG de todas las propiedades del CardioCuerpo incluyendo efectos sobre todos los canales iónicos, cronotropismo y aparición de arritmias;
- Sistema totalmente *in vitro*, no es necesaria una preparación laboriosa de las células
- Ahorro de tiempo y coste

[000155] Por tanto, en los diversos ensayos de la presente invención se pueden ensayar compuestos, en concreto compuestos cardio-activos, según los procedimientos descritos en los documentos DE19525285A1; Seiler y col., *ALTEX* 19 Suppl 1 (2002), 55-63; Takahashi y col., *Circulation* 107 (2003), 1912-1916, y Schmidt y col., *Int. J. Dev. Biol.* 45 (2001), 421-429; este último describe ensayos con células ES (EST) usados en un estudio de validación de la Unión Europea para el cribado de agentes embriotóxicos determinando de forma dependiente de la concentración la diferenciación de células ES en células cardiacas y miogénicas.

[000156] Las células y tejido del SNC también se pueden analizar usando una matriz de electrodos como se describió anteriormente. Los medios y procedimientos para analizar las interacciones reguladoras de actividad neuronal de cultivos celulares y tisulares en matrices de microelectrodos son conocidos por los expertos en la materia; véase, por ejemplo, el documento Bergen y col., *Brain Res. Brain Res. Protocol* 2003/11 (2003), 123-133, y la solicitud internacional WO01/65251. De forma similar, se pueden ensayar las células y tejido relacionados con el hígado; véase, p. ej., el documento US2003/0003573.

[000157] Las formulaciones preferibles de compuestos para ensayo no incluyen componentes adicionales, tales como conservantes, que tienen un efecto significativo sobre la formulación global; véase también anteriormente. Por tanto, las formulaciones preferibles consisten esencialmente en un compuesto biológicamente activo y un vehículo fisiológicamente aceptable, p. ej., agua, etanol, DMSO, etc. Sin embargo, si un compuesto es líquido sin un excipiente, la formulación puede consistir esencialmente en el propio compuesto. Además, se pueden realizar una pluralidad de ensayos simultáneamente con diferentes concentraciones de compuesto para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Como se sabe en la técnica, para la determinación de la concentración eficaz de un compuesto típicamente se usa un intervalo de concentraciones resultantes de diluciones 1:10, u otra escala logarítmica. Las concentraciones se pueden afinar adicionalmente con una segunda serie de diluciones, si es necesario. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

[000158] Los compuestos de interés abarcan diversas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas; véase también anteriormente. Los agentes candidatos comprenden los grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, especialmente puentes de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carbonilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se encuentran agentes candidatos entre biomoléculas incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

[000159] Los compuestos y agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes, incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales; véase también anteriormente. Por ejemplo, hay disponibles diversos medios para síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, hay disponibles, o se pueden producir fácilmente, bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, de plantas y animales. Por ejemplo, la inhibición de angiogénesis inducida por tumores y expresión de metaloproteinasas

de matriz en cultivos de confrontación de cuerpos embrioides y esferoides tumorales con ingredientes de plantas usados en la medicina tradicional china se han descrito en el documento Wartenberg y col. Lab. Invest. 83 (2003), 87-98.

5 **[000160]** Adicionalmente, las bibliotecas producidas de forma natural o sintética y los compuestos se pueden modificar fácilmente con medios químicos, físicos o bioquímicos convencionales y se pueden usar para producir bibliotecas combinatorias. Agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc., para producir análogos estructurales.

10 **[000161]** Los compuestos también se pueden incluir en una muestra que incluya fluidos a los que se hayan añadido componentes adicionales, por ejemplo, componentes que afectan a la fuerza iónica, pH, concentración total de proteínas, etc. Además, las muestras se pueden tratar para lograr al menos un fraccionamiento o concentración parciales. Se pueden almacenar muestras biológicas si se tiene cuidado para disminuir la degradación del compuesto, p. ej., en nitrógeno, por congelación o una combinación de los mismos. El volumen de muestra usado es suficiente para posibilitar una detección medible; habitualmente, de aproximadamente 0,1 μ l a 1 ml de muestra biológica es suficiente.

15 **[000162]** Los compuestos de ensayo incluyen todas las clases de moléculas descritas anteriormente y pueden comprender muestras de contenido desconocido. Aunque muchas muestras comprenderán compuestos en disolución, también se pueden ensayar muestras sólidas que se puedan disolver en un disolvente adecuado. Muestras de interés incluyen muestras ambientales, p. ej., agua subterránea, agua de mar, residuos mineros, etc.; muestras biológicas, p. ej., lisados preparados a partir de cosechas, muestras de tejidos, etc.; muestras de fabricación, p. ej., ciclos de tiempo durante la preparación de productos farmacéuticos; así como bibliotecas de compuestos preparados para análisis; y similares. Evaluándose los compuestos de interés respecto al potencial valor terapéutico, es decir, candidatos a fármacos.

20 **[000163]** El compuesto de ensayo, opcionalmente, puede ser una biblioteca combinatoria para cribar una pluralidad de compuestos. Una colección de este tipo de sustancias de ensayo tiene una diversidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 , que se reduce sucesivamente al realizar el procedimiento, opcionalmente combinado con otros, dos veces o más. Los compuestos identificados en el procedimiento de la invención se pueden, adicionalmente, evaluar, detectar, clonar, secuenciar y similares, bien en disolución o bien después de su unión a un soporte sólido, mediante cualquier procedimiento habitualmente aplicado a la detección de una secuencia específica de ADN, tal como mediante PCR, restricción de oligómeros (Saiki y col., Bio/Technology 3 (1985), 1008-1012,) análisis con sonda de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO) (Conner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 80 (1983), 278), ensayos de unión a oligonucleótidos (OLA) (Landegren y col., Science 241 (1988), 1077) y similares. Se han recogido técnicas moleculares para el análisis de ADN (Landegren y col., Science 242 (1988), 229-237). Por tanto, el procedimiento de la presente invención también se puede usar para obtener el perfil transcripcional de la célula diferenciada *in vitro*; véanse, p. ej., los documentos Ramalho-Santos y col., Science 298 (2002), 597-600; Tanaka y col., Genome Res. 12 (2002), 1921-1928.

30 **[000164]** El ensayo basado en células de la presente invención es especialmente adecuado para proporcionar patrones de referencia de modulación y bases de datos de patrones de referencia de modulación para una amplia variedad de compuestos biológicamente activos. Los patrones de referencia se usan entonces para la identificación y clasificación de compuestos de ensayo. La evaluación de compuestos de ensayo se puede usar para lograr diferentes resultados.

35 **[000165]** Los procedimientos para la clasificación de agentes biológicos según la firma de densidad espectral de cambios provocados en el potencial eléctrico celular son conocidos por los expertos en la materia; véase, p. ej., la patente estadounidense nº 6.377.057. Por tanto, los compuestos biológicamente activos se clasifican según su efecto sobre canales iónicos, cambios en el potencial de membrana y corrientes iónicas y el contenido de frecuencia de los potenciales de acción que el(los) compuesto(s) provocan en células excitables. Los cambios en la densidad espectral de tal potencial de membrana o potencial de acción provocado son una característica de cada tipo de canal que es modulado por el compuesto de ensayo. Se determina un patrón de cambios espectrales en el potencial de membrana poniendo en contacto una célula sensible con un compuesto y monitorizando el potencial de membrana o corrientes iónicas con el tiempo. Estos cambios se correlacionan con el efecto de ese compuesto, o clase de compuestos, sobre los canales iónicos de la célula sensible. Este patrón de cambios espectrales proporciona una única firma para el compuesto y proporciona un procedimiento útil para la caracterización de agentes de modulación de canales. El efecto de un compuesto sobre un canal iónico y sobre el potencial de acción de una célula viva puede proporcionar información útil sobre la clasificación e identidad del compuesto. Los procedimientos y medios para extraer tal información son de especial interés para el análisis de compuestos biológicamente activos, con aplicaciones específicas en cribado farmacéutico, descubrimiento de fármacos, monitorización ambiental, detección y clasificación de armas biológicas y similares. Ejemplos de biosensores basados en células completas se describen en los documentos Gross y col., Biosensors and Bioelectronics 10

(1995), 553-567; Hickman y col. Abstracts of Papers American Chemical Society 207 (1994), BTEC 76; y Israel y col. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 27 (1990), H1906-H1917.

5 **[000166]** El documento Connolly y col., Biosens. Biores. 5 (1990), 223-234, describe una matriz plana de microelectrodos desarrollados para monitorizar la actividad eléctrica de células en cultivo. El dispositivo posibilita la incorporación de características topográficas superficiales en una capa aislante por encima de los electrodos. Se usa la tecnología de semiconductores para la fabricación de electrodos de oro y para la deposición de una capa aislante de nitruro de silicio e impresión de un patrón en la misma. Los electrodos se ensayaron usando un cultivo de células cardíacas de embriomocitos de pollo y se correlacionó el latido físico de las células cultivadas con las mediciones de voltaje extracelular simultáneas obtenidas. El control molecular de los canales iónicos cardíacos se recogen en el documento Clapham, Heart Vessels Suppl. 12 (1997), 168-169. En el documento Oberg y Samuelsson, J. Electrocardiol. 14 (1981), 13942, realiza un análisis de Fourier sobre las fases de repolarización de los potenciales de acción cardíacos. En el documento se describe un modelo matemático de actividad electrofisiológica en aurícula de rana toro.

15 **[000167]** Existe una gran cantidad de bibliografía sobre el tema general de los canales iónicos. Se puede encontrar una recopilación de bibliografía en la serie de libros "The Ion Channel Factsbook", volúmenes 1-4, de Edward C. Conley y William J. Brammar, Academic Press. Se proporciona una perspectiva general de: canales iónicos con puertas a ligandos extracelulares (ISBN: 0121844501), canales con puertas a ligandos intracelulares (ISBN: 012184451X), canales intercelulares y rectificadores de entrada (ISBN: 0121844528) y canales con puertas para voltaje (ISBN: 0121844536). El documento de Hille, B. (1992) "Ionic Channels of Excitable Membranes", 2.sup.nd Ed. Sunderland MA: Sinauer Associates, también recoge información sobre canales de potasio.

20 **[000168]** En un ejemplo, las células se acoplan con un sustrato de tal forma que se pueden medir los cambios electrofisiológicos en las células en respuesta a estímulos externos, p. ej., para uso como cribado de elevada productividad para sustancias bioactivas. Las células también se pueden transfectar con ADN que se dirija a, exprese o inactive genes específicos o productos génicos en la célula. Al proporcionar tales células montadas sobre chips acopladas con dispositivos de medición, tales como un ordenador, se pueden cribar muchos compuestos de forma rápida y precisa. Las células o los chips también se podrían acoplar al dispositivo de medición en matrices para cribado simultáneo a gran escala.

25 **[000169]** Los procedimientos de ensayo de la presente invención pueden tener un formato convencional de laboratorio o se pueden adaptar para una elevada productividad. La expresión "elevada productividad" (HTS) se refiere al diseño de un ensayo que permite un análisis sencillo de múltiples muestras simultáneamente y con capacidad para manipulación robótica. Otra característica deseada en los ensayos de elevada productividad es el diseño de un ensayo optimizado para disminuir el uso de reactivos o minimizar el número de manipulaciones para lograr el análisis deseado.

30 **[000170]** En otra realización preferible, el procedimiento de la presente invención comprende realizar 2, 3, 4, 5, 7, 10 o más mediciones, opcionalmente en diferentes posiciones dentro de la matriz. Se pueden combinar diversas sustancias de ensayo y añadir simultánea o secuencialmente para obtener información sobre posibles efectos de mejora o extinción. Por tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, en el que dicha etapa de puesta en contacto incluye adicionalmente poner en contacto dicha muestra de ensayo con al menos una segunda sustancia de ensayo en presencia de dicha primera sustancia de ensayo. Dos o más sustancias ensayadas en combinación proporcionarán información sobre su interacción en general. En una realización de los procedimientos de cribado de la presente invención, se añade a la muestra o medio de cultivo un compuesto que se sabe que activa o inhibe el proceso de la enfermedad.

35 **[000171]** Además, los procedimientos anteriormente mencionados pueden, por supuesto, ser combinados con una o más etapas de cualquiera de los procedimientos de cribado anteriormente descritos u otros procedimientos de cribado muy conocidos en la técnica. Los procedimientos para el descubrimiento de compuestos para uso clínico comprenden, por ejemplo, cribado de ultra elevada productividad (Sundberg, Curr. Opin. Biotechnol. 11 (2000), 47-53) para identificación del compuesto de partida y diseño del fármaco en base a su estructura (Verlinde y Hol, Structure 2 (1994), 577-587) y química combinatoria (Salemme y col., Structure 15 (1997), 319-324) para optimización del compuesto de partida. Cuando se ha seleccionado un fármaco, el procedimiento puede tener la etapa adicional de repetir el procedimiento usado para realizar un diseño racional del fármaco usando el fármaco modificado y evaluar si dicho fármaco modificado muestra mejor afinidad según, por ejemplo, análisis de interacción/energía. El procedimiento de la presente invención se puede repetir una o más veces, de tal forma que la diversidad de dicha colección de compuestos disminuye sucesivamente.

40 **[000172]** Las sustancias se metabolizan después de su administración *in vivo* para ser eliminadas bien por excreción o bien por metabolización de uno o más metabolitos activos o inactivos (Meyer, J. Pharmacokinetic. Biopharm. 24 (1996), 449-459). Por tanto, en vez de usar el propio compuesto o fármaco identificado y obtenido según los procedimientos de la presente invención, se puede usar una formulación correspondiente como un pro-

fármaco que se convierte en su forma activa en el paciente mediante su metabolismo. En la bibliografía se describen medidas preventivas que se pueden tomar para la aplicación de pro-fármacos y fármacos; véase una recopilación en el documento Ozama, J. Toxicol. Sci. 21 (1996), 323-329.

5 **[000173]** Además, la presente invención se refiere al uso de un compuesto identificado, aislado y/o producido mediante cualquiera de estos procedimientos para la preparación de una composición para el tratamiento de trastornos relacionados, por ejemplo, con tejido dañado o tejido anómalo o formación de órganos, insuficiencia cardiaca, etc.; véase también anteriormente. Preferiblemente, el compuesto aislado o fármaco correspondiente es útil para el tratamiento de una cardiomiopatía. Como procedimiento de tratamiento, la sustancia identificada o la
10 composición que la contiene se puede administrar a un sujeto que padece un trastorno de este tipo. Los compuestos identificados, aislados y/o producidos por el procedimiento descrito anteriormente también se pueden usar como compuestos de partida en el descubrimiento de fármacos y preparación de fármacos o pro-fármacos. Esto habitualmente implica modificar el compuesto de partida o un derivado del mismo o un compuesto aislado como se describió anteriormente, tal como modificando dicha sustancia para alterar, eliminar y/o producir un derivado de una
15 porción del mismo que se sospeche que produce toxicidad, aumentando la biodisponibilidad, solubilidad y/o vida media. El procedimiento puede comprender adicionalmente mezclar la sustancia aislada o modificada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se conocen en la técnica las diversas etapas enumeradas anteriormente de manera general. 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 procedimientos para la preparación de derivados y análogos químicos son muy conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en los documentos Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 EEUU y Organic Synthesis, Wiley, New York, EEUU. Además, se pueden usar peptidomiméticos y/o diseño informatizado de derivados y análogos apropiados, por ejemplo, según los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos para la generación compuesto de partida en el
20 descubrimiento de fármacos también incluyen usar proteínas y procedimientos de detección tales como espectrometría de masas (Cheng y col. J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), 8859-8860) y algunos procedimientos de resonancia magnética nuclear (NMR) (Fejzo y col., Chem. Biol. 6 (1999), 755-769; Lin y col., J. Org. Chem. 62 (1997), 8930-8931). También pueden incluir o basarse en análisis de relaciones cuantitativas 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, el documento Holzgrave y Bechtold, Pharm. Acta Helv. 74 (2000), 149-155). Además, se pueden encontrar ejemplos de vehículos y procedimientos de formulación en el documento Pharmaceutical Sciences de Remington.

[000174] Cuando un fármaco se ha seleccionado según uno cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos de la presente invención, el fármaco o un pro-fármaco del mismo se puede sintetizar en una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de fármaco o pro-fármaco que es suficiente para poner de manifiesto un beneficio significativo en el paciente, es decir, tratamiento, curación, prevención o mejora de tejido dañado, o un aumento en la velocidad de tratamiento, curación, prevención o mejora de tales estados. Además, o alternativamente, en
40 concreto respecto al ensayo preclínico del fármaco, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye la cantidad total de fármaco o producto que es suficiente para provocar una respuesta fisiológica en un ensayo en un animal no humano.

[000175] En una realización, el procedimiento de la invención puede comprender adicionalmente mezclar la sustancia aislada o modificada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar ejemplos de vehículos y procedimientos de formulación en el documento Pharmaceutical Sciences de Remington.

[000176] La presente invención también se refiere a composiciones de kits que contienen reactivos específicos tales como los descritos anteriormente en el presente documento útiles para llevar a cabo uno cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos de la presente invención, que contienen el vector o la composición de vectores descritos anteriormente en el presente documento, células multi o pluripotentes, siempre que las células no sean embriocitos indiferenciados humanos o un derivado de los mismos o células germinales embrionarias humanas o un derivado de las mismas, y, opcionalmente, medio de cultivo, moléculas de ácido nucleico recombinante, agentes fisiológicamente activos, compuestos patrón, etc. Un kit de este tipo comprendería, típicamente, un vehículo compartimentado adecuado para permanecer encerrado en al menos un envase. El vehículo comprendería adicionalmente reactivos útiles para realizar dichos procedimientos. El vehículo también puede contener un medio de detección tal como sustratos con enzimas marcados o similares. Se pueden proporcionar instrucciones para detallar el uso de los componentes del kit, tales como instrucciones por escrito, presentaciones en video o instrucciones en un formato que se pueda abrir en un ordenador (p. ej., un disquete o disco de CD-ROM). Estas instrucciones indican, por ejemplo, cómo usar las células para cribar agentes de ensayo de interés (tales como fármacos inotrópicos).

[000177] Además, la presente invención se refiere a un equipo y a una matriz, respectivamente, para uso en los procedimientos y ensayos de la presente invención descritos en el presente documento. Por ejemplo, en la solicitud

de patente europea EP0689051A3 se describe un equipo de medición del potencial celular que tiene una pluralidad de microelectrodos y que se puede usar y/o adaptar según las enseñanzas de la presente invención.

5 **[000178]** Además, la solicitud internacional WO98/54294 describe un equipo y un procedimiento para monitorizar células y un procedimiento para monitorizar el cambio en las células tras la adición de un analito al entorno de la célula, que comprende un dispositivo que incluye una matriz de microelectrodos dispuesta en una cámara de cultivo celular, matriz sobre la cual se adhiere una porción de células a las superficies de los microelectrodos. El diámetro de las células es mayor que los diámetros de los microelectrodos. Se aplica una señal de voltaje entre cada uno de los microelectrodos y un electrodo de referencia. La detección y monitorización de las
10 señales resultantes de la aplicación de la señal de voltaje proporciona información relativa a las características eléctricas de las células individuales, incluyendo impedancia (capacitancia y conductancia de la membrana celular combinadas), parámetros del potencial de acción, capacitancia de la membrana celular, conductancia de la membrana celular y resistencia de sellado entre célula/sustrato.

15 **[000179]** En la bibliografía se pueden encontrar medios y procedimientos adicionales que se pueden implementar según las enseñanzas de la presente invención, véanse, por ejemplo, los documentos Egert y col., Brain Res. Brain Res. Protoc. 2 (1998), 229-242; Duport y col., Biosens. Bioelectron. 14 (1999), 369-376 y la solicitud de patente alemana DE19529371A1.

20 **[000180]** Como ya se ha analizado en el contexto del sistema de ensayo de la presente invención para cribar supuestos fármacos, las observaciones realizadas según la presente invención también se pueden aplicar para establecer un procedimiento novedoso de identificación de supuestos genes diana para intervención terapéutica durante el tratamiento de una enfermedad determinada. Por tanto, según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación y/o obtención de un gen o producto génico implicado en una
25 enfermedad como la diana de un fármaco, que comprende obtener el perfil de la expresión de una célula diferenciada *in vitro* como se definió anteriormente antes y después de la inducción de dicho fenotipo, en el que la expresión diferencial de un gen o producto génico es indicativa de una potencial diana del fármaco y, opcionalmente, que comprende clonar el gen identificado o un correspondiente ADNc o fragmento del mismo. El fenotipo de enfermedad se puede inducir, por ejemplo, añadiendo un compuesto fisiológicamente activo como se describió anteriormente. Las técnicas para ensayar la expresión diferencial son muy conocidos por los expertos en la materia; véanse también las referencias citadas en el presente documento. Asimismo, la clonación de las secuencias identificadas se puede realizar según procedimientos estándar tales como los descritos en el documento de Sambrook y col. y otros; véase también anteriormente.

35 **[000181]** Por tanto, las células diferenciadas *in vitro* también son de interés en la identificación de patrones de expresión de transcritos y proteínas recientemente sintetizadas que son características de un estado de enfermedad. Se obtienen los patrones de expresión de las células diferenciadas y se comparan con líneas de células de control, tales como células diferenciadas, que se han tratado así para inducir el fenotipo de enfermedad. El uso de micromatrices en el análisis de la expresión de genes se recoge de forma general en el documento Fritz y col.,
40 Science 288 (2000), 316; Microarray Biochip Technology, www.Gene-Chips.com. Un ejemplo de procedimiento se realiza usando un generador de matrices de Genetic Microsystems y un escáner de Axon GenePix. Se preparan micromatrices amplificando primero fragmentos de ADNc que codifican secuencias de marcadores que se analizarán y se colocan directamente sobre portaobjetos de vidrio para comparar las preparaciones de ARNm de dos células de interés; una preparación se convierte en ADNc marcado con Cy3, mientras que la otra se convierte en ADNc marcado con Cy5. Las dos preparaciones de ADNc se hibridan simultáneamente en el portaobjetos de micromatrices y, a continuación, se lavan para eliminar las uniones no específicas. A continuación el portaobjetos se escanea con longitudes de onda apropiadas para cada uno de los marcadores, se cuantifica la fluorescencia resultante y los resultados se procesan para proporcionar una indicación de la abundancia relativa de ARNm para cada marcador de la matriz. Además, se puede usar hibridación sustractiva y supresora (SSH). Los ensayos de SSH y los usos de los
50 mismos se describen, por ejemplo, en la solicitud internacional WO03/093501. En concreto, se proporcionan procedimientos de identificación y aislamiento de secuencias de ácido nucleico, que son únicas para una célula, tejido u organismo determinados, en los que dichas secuencias de ácido nucleico únicas están relacionadas con, por ejemplo, genes enfermos. También se describe una descripción de cómo realizar la hibridación sustractiva y supresiva en los documentos Diatchenko y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 93 (1996), 6025-6030; Diatchenko y col., Meth. Enzym. 303 (1999), 349-380; y la solicitud internacional WO96/23079.

60 **[000182]** A partir de lo anterior, también es evidente que el procedimiento de la presente invención se puede adaptar para validar una diana potencial de un fármaco, por ejemplo, induciendo la expresión de un gen diana en la célula diferenciada *in vitro* durante la inducción del fenotipo de enfermedad y monitorizando si la expresión del gen diana suprime o favorece de la enfermedad. Por tanto, según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de validación de una potencial diana de un fármaco que comprende (a) modificar la expresión de un gen diana y/o actividad del producto génico diana en una célula diferenciada *in vitro* como se describió anteriormente antes, durante o después de que en dicha célula se induzca la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula, tejido u órgano enfermos; y (b) determinar un cambio

sensible del fenotipo de dicha célula, en el que un cambio sensible (i) que evite o retrase el inicio o la progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de que se activará una diana de un fármaco, y (ii) si potencia el inicio o progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de que se inhibirá una diana de un fármaco para el tratamiento de la enfermedad.

5 **[000183]** Este aspecto de la presente invención es especialmente útil para determinar los efectos sinérgicos de componentes en enfermedades multifactoriales, por ejemplo, enfermedades que se determinan por mutaciones en diversos genes y/o están basadas en la predisposición genética así como en factores ambientales.

10 **[000184]** Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento de realización de la comercialización del descubrimiento de un fármaco que comprende:
 - proporcionar uno o más sistemas de ensayo o componentes de los mismos tal como se describe en el presente documento para identificar un candidato a fármaco; y/o
 15 - realizar la obtención del perfil terapéutico de los fármacos identificados en la etapa anterior, o análogos adicionales de los mismos, respecto a su eficacia y toxicidad según los ensayos de la presente invención; y
 - formular una preparación farmacéutica incluyendo uno o más fármacos identificados en la etapa anterior que tengan un perfil terapéutico aceptable.

20 **[000185]** Usando los procedimientos anteriormente descritos se puede determinar la identidad de un fármaco. Los agentes se identifican por su capacidad de modificar determinados parámetros tales como los descritos anteriormente en el presente documento, p. ej., los descritos para las MEA. Para los compuestos de partida adecuados que se han identificado se puede llevar a cabo la obtención de un perfil terapéutico adicional del agente, o análogos del mismo, para evaluar su eficacia y toxicidad en animales. Aquellos compuestos que tienen perfiles terapéuticos tras su ensayo en animales se pueden formular como preparaciones farmacéuticas para uso en seres
 25 humanos o para usos veterinarios. El procedimiento de comercialización puede incluir una etapa adicional de establecimiento de un sistema de distribución para la distribución de la preparación farmacéutica para su venta y puede incluir, opcionalmente, establecer un grupo de ventas para publicitar la preparación farmacéutica.

30 **[000186]** En vez de desarrollar el fármaco identificado en la propia empresa, el desarrollo adicional del fármaco también se puede realizar en una empresa diferente. Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento de realización de la comercialización del descubrimiento de una diana que comprende:
 - proporcionar uno o más sistemas de ensayo descritos en el presente documento o componentes de los mismos para identificar un fármaco;
 - alternativamente, o además, realizar la obtención del perfil terapéutico de fármacos respecto a su eficacia y
 35 toxicidad según los ensayos de la presente invención; y
 - conceder, a una tercera parte, los derechos para el desarrollo adicional del fármaco y/o las ventas de los fármacos identificados o cuyo perfil se ha obtenido, o análogos de los mismos.

40 **[000187]** Para compuestos de partida adecuados que se han identificado se puede llevar a cabo la obtención de un perfil adicional del agente, o análogos adicionales del mismo, para evaluar su eficacia y toxicidad en animales, dependiendo de las modalidades del acuerdo con la respectiva tercera parte. El desarrollo adicional de los compuestos para uso en seres humanos o para usos veterinarios será realizado entonces por una tercera parte. El procedimiento de comercialización habitualmente implicará la venta o concesión de los derechos de desarrollo de dicho compuesto, pero también se puede realizar como un servicio, ofrecido a empresas de desarrollo de fármacos
 45 por una tarifa.

[000188] La presente invención también se refiere a fármacos identificados según los procedimientos y ensayos descritos anteriormente, así como a composiciones farmacéuticas para uso en terapia, que comprenden un fármaco de este tipo. El fármaco según la invención se puede combinar con diluyentes o vehículos adecuados, preferiblemente aquellos que son farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de tales vehículos, diluyentes y procedimientos de formulación se pueden encontrar en el documento Pharmaceutical Sciences de Remington. Para formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para una administración eficaz, tales composiciones contendrán una cantidad eficaz del modulador. Los vehículos o diluyentes son habitualmente estériles y no tóxicos, y se definen como vehículos habitualmente usados para formular composiciones
 50 farmacéuticas para administración a animales o humanos. El diluyente se selecciona de forma que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, salino fisiológico, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos y no inmunogénicos y similares. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de modulador que es suficiente para lograr el efecto deseado sobre la diferenciación de las células diana.
 55 60

[000189] Ejemplos adicionales de vehículos farmacéuticamente adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tampón fosfato, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales vehículos se pueden

formular mediante procedimientos convencionales muy conocidos. Por consiguiente, la presente invención también proporciona un procedimiento de realización de una composición farmacéutica para uso en la modulación de la diferenciación celular que comprende mezclar un modulador de diferenciación celular identificado según un procedimiento de la invención con un diluyente o vehículo adecuado.

[000190] La concentración adecuada del agente terapéutico podría depender del agente concreto. La dosis terapéuticamente eficaz se tiene que comparar con las concentraciones tóxicas; la tasa de eliminación, así como los productos metabólicos, juegan un papel, al igual que lo hace la solubilidad y la formulación. La eficacia terapéutica y la toxicidad de los compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD50 (la dosis mortal en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y los tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL50/DE50.

[000191] En una realización preferible, los productos terapéuticos de la invención se administran terapéutica y, preferiblemente, de manera profiláctica, a pacientes que padecen o tienen peligro de padecer enfermedad de hipertrofia cardiaca, preferiblemente hipertrofia cardiaca por sobrecarga de presión, han padecido anteriormente hipertensión sistemática o cuadros de estenosis aórtica, o exhiben uno o más de los "factores de riesgo" de hipertrofia cardiaca (es decir, una característica, comportamiento o trastorno relacionados con mayor incidencia de hipertrofia cardiaca) o uno o más de los estados asociados con la hipertrofia cardiaca; véanse los documentos Hutter, "Congestive Heart Failure", en *Scientific American: Medicine*, Volumen 1(1:II), eds. Dale y Federman (Scientific American, Inc. 1994) y "Hypertrophic Cardiomyopathy", en *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Capítulo 27, 519-522, eds. Berkow y col. (Merck Sharp & Dohme Research Laboratories 1987).

[000192] Los principales signos de predisposición para predisposición a hipertrofia cardiaca son dolores torácicos, síncope, palpitaciones, disnea por esfuerzo o síntomas de estenosis aórtica o arteriopatía coronaria, o cualquier combinación de los signos anteriores. El dolor torácico es habitualmente típico en la angina relacionada con esfuerzos. El síncope es habitualmente por esfuerzos, debido a una combinación de arritmia, obstrucción del tracto de flujo de salida y llenado diastólico del ventrículo. La disnea por esfuerzo es el resultado de una pequeña elasticidad diastólica del ventrículo izquierdo que conduce a un rápido aumento de la LVEDP a medida que aumenta el flujo. Las palpitaciones se producen por arritmias ventriculares o auriculares.

[000193] Los pacientes que padecen insuficiencia cardiaca también pueden tener predisposición a hipertrofia cardiaca. A modo de ejemplo, pero no a modo de limitación, la arteriopatía coronaria, cardiomiopatía, miocarditis, estenosis aórtica, coartación aórtica, regurgitación aórtica, regurgitación mitral, derivaciones izquierda-derecha, cardiomiopatía restrictiva, cardiopatía isquémica, taponamiento pericárdico y pericarditis constrictiva cardiomiopatía restrictiva pueden aumentar la probabilidad de que un paciente padezca hipertrofia cardiaca.

[000194] Los productos terapéuticos de la invención también se pueden administrar con fármacos que tratan o mejoran el efecto de determinados factores de riesgo de hipertrofia cardiaca. En una realización preferible, un producto terapéutico de la invención se administra con uno o más fármacos antihipertrofia cardiaca tales como, pero sin limitarse a, bloqueadores de [beta]-adrenorreceptor y bloqueadores de los canales de Ca, o se realiza en conjunción con terapia antiarrítmica, profilaxis con antibióticos o tratamiento quirúrgico en forma de miotomía séptica, miormectomía o sustitución de la válvula mitral.

[000195] Los expertos de la materia poseen los conocimientos para monitorizar y ajustar el tratamiento o régimen profiláctico para tratar o prevenir la enfermedad por hipertrofia cardiaca tratando o previniendo a la vez otras enfermedades o trastornos potencialmente asociados, tales como hipertensión sistemática.

[000196] La descripción y los ejemplos de la presente invención desvelan y abarcan estas y otras realizaciones. Se puede encontrar bibliografía adicional relativa a uno cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos que se usarán según la presente invención en bibliotecas y bases de datos públicas usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, se puede usar la base de datos publica "Medline", que es alojada por el organismo National Center for Biotechnology Information y/o por la Biblioteca Nacional de Medicina de los organismos National Institutes of Health. Bases de datos y direcciones web adicionales, tales como las del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), que es parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), son conocidas por los expertos en la materia y también se pueden obtener usando motores de búsqueda en Internet. En el documento TIBTECH 12 (1994), 352-364, se proporciona una perspectiva general de información de patentes de biotecnología y un estudio de fuentes pertinentes de información de patentes útiles para una búsqueda retrospectiva y para tomar conciencia de la situación actual.

[000197] La memoria descriptiva anterior describe de forma general la presente invención. A lo largo del texto de esta memoria se mencionan varios documentos. Todas las citas bibliográficas se pueden encontrar al final de la memoria inmediatamente antes de las reivindicaciones. No se da por admitido que alguno de los documentos citados sea un documento de la técnica anterior para la presente invención.

[000198] La memoria descriptiva anterior describe de forma general la presente invención. Se pueden lograr una comprensión más completa en referencia a los ejemplos específicos siguientes que se proporcionan en el presente documento con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

[000199] Los ejemplos que se exponen a continuación ilustran adicionalmente la invención, pero no se deben interpretar como limitativos del alcance de la invención en modo alguno. Se pueden encontrar descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los usados en el presente documento, en la bibliografía citada; véase también "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Decimoséptima Ed. por Beers y Berkow (Merck & Co., Inc. 2003)

[000200] La puesta en práctica de la presente invención usará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos ordinarios en la materia.

[000201] Procedimientos de genética molecular e ingeniería genética se describen de forma general 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, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames y Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames y Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney y Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller y Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (Ausubel y col., eds.); y Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu y col., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); 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, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986). Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genética que se cita en la presente memoria descriptiva están disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen y Clontech. Técnicas generales de cultivo celular y recogida de medios se exponen en los documentos 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); Extracting information from cDNA arrays, Herzel y col., CHAOS 11 (2001), 98-107.

Ejemplo 1: Generación de cardiomiocitos hipertróficos a partir de embriocitos indiferenciados

[000202] Actualmente se usan cardiomiocitos preparados a partir de corazones de roedores como el modelo *in vitro* estándar para estudiar cardiomiocitos hipertróficos a nivel molecular (Chlopickova y col., Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 145 (2001), 49-55). Estas células muestran, tras estimulación, numerosas características de cardiomiocitos hipertróficos *in vivo* (Chien y col., FASEB J. 5 (1991), 3037-3046). Se pueden usar diversas sustancias como los estímulos hipertróficos en este sistema, incluyendo endotelinas (Shubeita y col., J. Biol. Chem. 265 (1990), 20555-20562; Suzuki y col., FEBS Lett. 268 (1990), 149-151; Ito y col., Circ. Res. 69 (1991), 209-215), agonistas 1-adrenérgicos (Simpson, Circ. Res. 56 (1985), 884-894; Meidell y col., Am. J. Physiol. 251 (1986), H1076-H1084; Henrich y Simpson, J. Mol. Cell Cardiol. 20 (1988), 1081-1085); y Angiotensina II (Sadoshima y Izumo, Circulation Research 73 (1993), 413-423). También los estímulos mecánicos pueden inducir un fenotipo hipertrófico en este modelo (Komuro y col., J. Biol. Chem. 265 (1990), 3595-3598; Sadoshima y col., J. Biol. Chem. 267 (1992), 10551-10560).

[000203] Los cardiomiocitos hipertróficos en ese sistema de cultivo celular se caracterizan por un mayor tamaño, mayor síntesis proteica, aumento del ensamblaje sarcomérico y re-expresión de un programa de genes fetales, p. ej., mayor expresión del gen del ANF (factor natriurético auricular). Para ensayar si los cardiomiocitos derivados de embriocitos indiferenciados (células ES) muestran características similares tras la estimulación, se realizaron los siguientes experimentos. Se generaron cardiomiocitos con verde fluorescente según las enseñanzas de las solicitudes internacionales WO99/01552 y WO02/051987 de la forma siguiente. Las células ES (línea D3, ATCC, CRL 1934), que se habían transfectaron mediante un vector bicistrónico que contenía genes para la proteína verde fluorescente (GFP) y resistencia a la puomicina bajo el control transcripcional del promotor de cadena pesada de 2-miosina (véase documento WO02/051987), fueron inducidas a formar agregados (cuerpos embrioides, EB) en ausencia de LIF, bien según el procedimiento de los documentos WO99/01552 y WO02/051987, respectivamente, o bien según se describe en la solicitud de patente europea nº 03015401.7. Los EB se cultivaron durante 9 días en IMDM (Invitrogen) suplementado con 20% de FCS (Invitrogen, controlado por lotes) a 37°C, al 5% de CO₂ y el 95% humedad en placas bacteriológicas de 10 cm (Greiner). A continuación, se añadió puomicina (Sigma, 2,5 µg/ml) al

medio de cultivo celular y las células se cultivaron durante 10 días adicionales. Las células se transfirieron entonces a una capa de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados en una placa de 24 pocillos (Costar) y se cultivaron durante dos días, en ausencia de puomicina (IMDM, 20% de FCS). Después de dos días, el medio con suero se sustituyó por un medio sin suero (Medio 199, Invitrogen). Después de 24 h de privación de suero, las células se estimularon durante 24 h mediante la adición de endotelina-1 (100 nM, Sigma) o fenilefrina (200 μ M, Sigma).

[000204] Como se demuestra en la Fig. 1, los cardiomiocitos derivados de células ES aumentan su tamaño tras la estimulación con endotelina-1 y fenilefrina. La inmunotinción para sarcomérico-actina (clon EA-53, Sigma) revela que estos estímulos conducen a un aumento en la organización sarcomérica (Fig. 2). Por tanto, los cardiomiocitos derivados de células ES reaccionan a estos estímulos de forma similar a la descrita para cardiomiocitos de roedores obtenidos a partir de preparaciones cardíacas (p. ej., Yanazume y col., *Mol. Cell Biol.* 23 (2003), 3593-3606; Vara y col., *J. Biol. Chem.* 278 (2003), 21388-21394; Pikkarainen y col., *J. Biol. Chem.* 278 (2003), 3969-3975; Molkentin y col., *Cell* 93 (1998), 215-228).

[000205] En un experimento adicional, se analizó la posible inducción de un programa de genes embrionarios tempranos por estimulación con endotelina-1, angiotensina II o fenilefrina. Con este propósito, se obtuvieron cardiomiocitos derivados de células ES resistentes a la puomicina como se describió anteriormente; sin embargo, después de los últimos 9 días en un medio sin puomicina, las células no se transfirieron a una capa sustrato sino que se mantuvieron en cultivo en suspensión. Después de privación de suero durante 24 h mediante cultivo en Medio 199, las células se estimularon durante 24 h mediante adición de endotelina-1, fenilefrina o angiotensina II (Sigma). Se extrajo ARN y se realizó la transcripción inversa usando procedimientos estándar.

[000206] Se analizó la expresión del ANF y del péptido natriurético cerebral (BNP) mediante amplificación por PCR de los respectivos ADNc.

[000207] La Fig. 3 demuestra que las células estimuladas con endotelina-1 o fenilefrina muestra mayor expresión del ANF y del BNP en comparación con la muestra de control. La estimulación con angiotensina II conduce a un modesto aumento en la expresión del ANF y del BNP. La mayor expresión del ANF y del BNP es un signo distintivo de cardiomiocitos hipertróficos y se ha observado también en cardiomiocitos tratados con endotelina-1, angiotensina II y fenilefrina de preparaciones de corazón de roedores (Day y col., *Hypertension* 9 (1987), 485-491; Saito y col., *J. Clin. Invest.* 83 (1989), 298-305; Kawakami y col., *Clin. Sci.* 90 (1996), 197-204; Cameron y Ellmers, *Endocrinology* 144 (2003), 2191-2194).

[000208] En resumen, los experimentos descritos en esta sección demuestran que los cardiomiocitos derivados de células ES muestran características similares a los cardiomiocitos a partir de preparaciones de corazón de roedores respecto a la estimulación con endotelina-1, angiotensina II y fenilefrina.

Ejemplo 2: Regulación por aumento de la expresión del ANF en cardiomiocitos derivados de células ES de ratón transgénico para calcineurina constitutivamente activa

[000209] La hipertrofia cardíaca es una respuesta adaptativa del corazón a diferentes estímulos y va acompañada de diversos cambios de los cardiomiocitos a nivel molecular. Los estudios que analizan las características de este procedimiento han mostrado que el Ca^{2+} juega un papel fundamental y, por tanto, se cree que las proteínas implicadas en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} o proteínas reguladas por Ca^{2+} juegan un papel crítico en la respuesta hipertrófica (recogido en los documentos McLennan, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), 5291-5297; Frey y col., *Nat. Med.* 6 (2000), 1221-1227). Una proteína implicada en conectar las fluctuaciones de Ca^{2+} y en la regulación génica alterada es la proteína fosfatasa-2B dependiente de la Ca^{2+} -calmodulina, calcineurina (recogido en el documento Rao y col., *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997), 707-747). Un aumento en el calcio intracelular incrementa la activación de la calcineurina, que, en su forma activada, desfosforila el factor nuclear de las células T activadas (NFAT), activándola así (Okamura y col., *Mol. Cell* 6 (2000), 539-550; recogido en Crabtree, *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 2313-2316). Se demostró una conexión directa entre la calcineurina y la hipertrofia cardíaca en ratones transgénicos que expresan una forma activada de la calcineurina. Estos ratones desarrollan hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca que imitan la cardiopatía humana (Molkentin y col., *Cell* 93 (1998), 215-228). Se pueden obtener cardiomiocitos genéticamente modificados para estudios *in vitro* bien a partir de un animal correspondientemente modificado o mediante manipulación genética de cardiomiocitos primarios. Ambos procedimientos requieren tiempo y son caros. Por tanto, según la presente invención, el objetivo era generar cardiomiocitos que expresen calcineurina activada *in vitro* directamente a partir de células ES transgénicas. Con este propósito se generó una línea de células ES transgénicas que contienen un gen para una forma constitutivamente activa de la subunidad A catalítica de la calcineurina (O'Keefe y col., *Nature* 357 (1992), 692-694) bajo el control del promotor de MHC específico para cardiomiocitos. En primer lugar, se generó el vector MHC-pcDNA3 sustituyendo el promotor de CMV entre los sitios NruI-BamHI del vector pcDNA3 (Invitrogen) mediante el promotor de MHC (Genebank: U71441). Para obtener ADNc que codifique calcineurina constitutivamente activa, se extrajo ARN de corazón de ratón adulto y se usó para la generación de ADNc usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) y la Transcriptasa Inversa RNasaH SuperscriptTMII (Invitrogen), respectivamente, según el protocolo de los fabricantes.

La secuencia que codifica la subunidad A catalítica de la calcineurina sin el dominio autoinhibidor C-terminal, que corresponde a aa1-398 (O'Keefe y col., Nature 357 (1992), 692-694) se amplificó mediante PCR a partir de ADNc total de corazón de ratón. Los cebadores usados para la amplificación fueron 5'-GGACTAGTCCAGCCACCATGTCCGAGCCCAAGGC-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATTCAGTTTCTGATGACTTCCTTCCGG-3' (SEQ ID NO: 2), que albergan un sitio Spel y un sitio NotI, respectivamente. El producto de la PCR se clonó en el MHC-pcDNA3 entre los sitios Spel y NotI en el vector MHC-pcDNA3. El vector resultante se denominó MHC-Calci*-pcDNA3. La secuencia que codifica la calcineurina constitutivamente activa se verificó secuenciando el modelo usando los cebadores siguientes (directo 5'-CACCAGAAATGACAGAC-3', (SEQ ID NO: 3), inverso 5'-AAAGGACAGTGGGAGTG-3' (SEQ ID NO: 4) situado en el vector, directo 5'-CACTCGCTACCTCTTCT-3' (SEQ ID NO: 5), inverso 5'-TCGTACTTCAACTGC-3', (SEQ ID NO: 6) inverso 5'-AAATGTTCTGAGTCTT-3' (SEQ ID NO: 7)). Para posibilitar la selección de cardiomiocitos después de la diferenciación a partir de células ES, el vector PIG (véase el documento WO02/051987), que aloja un promotor de MHC que regula la expresión de una construcción gen-IRES-EGFP resistente a la puromicina, se transfectó simultáneamente con el vector MHCCalci* pcDNA3. Mediante adición de puromicina tras la diferenciación se pudieron seleccionar los cardiomiocitos e identificar mediante expresión de la EGFP. Los vectores MHC-Calci*-pcDNA3 y PIG se linearizaron con PvuI y SacI, respectivamente, y se co-transfectaron en células ES R1 (Nagy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 90 (1993), 8424-8428) mediante electroporación. Como control negativo se generó una segunda línea de células ES R1 que alojaba sólo la construcción PIG. Las células transfectadas se seleccionaron por resistencia a la neomicina. En caso de co-transfección de ambos vectores MHC-Calci*-pcDNA3 y PIG, se realizó el cribado por PCR para identificación de los clones que alojan ambas construcciones usando los cebadores siguientes: directo 5'-CCTCACCCCTGGCTTGT-3' (SEQ ID NO: 8) e inverso 5'-TTCCAGCCTGCCCTCCTT-3' (SEQ ID NO: 9), temperatura de renaturalización de 57°C para el MHC-Calci*-pcDNA3, que da lugar a un producto de 676 pb; directo 5'-CAAGGACGACGGCAACTAC-3' (SEQ ID NO: 10) e inverso 5'-CGCTTCTCGTTGGGTCT-3' (SEQ ID NO: 11), temperatura de renaturalización de 57°C para la detección de la construcción PIG, que da lugar a un fragmento de 345 pb.

[000210] La diferenciación de células que alojan ambos vectores MHC-Calci*-pcDNA3 y PIG se realizó como se indica a continuación: se cultivaron $1,5 \times 10^6$ células ES no diferenciadas / ml de medio de Iscove (Invitrogen) con 15% de FCS (Invitrogen) en agitación (50 rpm, 37°C, 5% de CO₂) y después de 6 h los cultivos se diluyeron al 1:10 y se cultivaron durante 12 h adicionales para inducir la formación de cuerpos embrioides (EB). Los EB se diluyeron adicionalmente hasta una concentración de 250 EB / 30 ml de medio de Iscove con 15% de FCS y se cultivaron adicionalmente en estas condiciones hasta el día 9 de diferenciación. Se realizó la RT-PCR para identificación de clones que expresaban el transcrito de la calcineurina constitutivamente activa usando los cebadores siguientes: directo 5'-CTGCTCCGACGATGAACT-3' (SEQ ID NO: 12) e inverso 5'-AAAGGACAGTGGGAGTGG-3' (SEQ ID NO: 13), temperatura de renaturalización de 57°C, tamaño del producto 258 pb. Se seleccionaron los clones que expresaban el transcrito de la calcineurina constitutivamente activa para análisis adicional. El clon MHC-Calci*-PIG que expresaba el transcrito de la calcineurina constitutivamente activa y un clon de control (que aloja solo el vector PIG) se diferenciaron como se describió en el Ejemplo 1. El día 9 de diferenciación, los cardiomiocitos se pudieron identificar mediante microscopía de fluorescencia en base a la expresión de la EGFP y la selección de cardiomiocitos se inició mediante adición de 2 mg/ml de puromicina al medio. La selección continuó durante 4 días y fue seguida de cultivo en medio de Iscove con 15% de FCS durante otros 5 días en ausencia de puromicina. El día 18 de diferenciación las células se privaron bien de suero en medio 199 (Invitrogen) sin FCS o bien, como control, se cultivaron adicionalmente en medio de Iscove con 15% de FCS durante otras 48 h. El ARN se preparó usando el kit RNeasy mini (Qiagen) seguido de análisis por RT-PCR. Los cebadores usados para la RT-PCR del ANF fueron: 5'-CTCCTTCTCCATCACCTG-3' (SEQ ID NO: 14) e 5'-TTTCCTCCTTGGCTGTTATC-3' (SEQ ID NO: 15), temperatura de renaturalización de 56°C, siendo el resultado de la PCR un producto de 468 pb. Para controlar la síntesis de ARN de entrada y ADNc, el ADNc de la gapdh se amplificó usando los cebadores siguientes: directo 5'-GTGTTCTACCCCAATGTG-3' (SEQ ID NO: 16) e inverso 5'-CTTGCTCAGTGTCCTTGCTG-3' (SEQ ID NO: 17), temperatura de renaturalización de 60°C, producto de PCR de 349 pb. Como indicación de un fenotipo hipertrofico, se mostraría un aumento de los niveles de ARN del ANF mediante análisis por RT-PCR de clones que expresan la forma constitutivamente activa de la calcineurina en comparación con clones de control (Fig. 4). La mayor expresión del ANF en cardiomiocitos es un signo distintivo de hipertrofia en cardiomiocitos y se ha indicado que se produce con la expresión de calcineurina constitutivamente activa *in vivo* en ratones transgénicos (Molkentin y col., 1998) así como *in vitro* en cardiomiocitos de rata primarios (De Windt y col., 2000). Por tanto, los cardiomiocitos derivados *in vitro* de células ES transgénicas para calcineurina constitutivamente activa muestran características similares a los sistemas experimentales convencionales anteriormente descritos de hipertrofia de cardiomiocitos.

Ejemplo 3: Efectos de compuestos sobre cardiomiocitos con hipertrofia

[000211] Para ensayar si los cardiomiocitos con hipertrofia obtenidos a partir de células ES como se describió en el Ejemplo 1 representan una herramienta adecuada con propósitos de cribado de fármacos, dichas células se trataron con compuestos conocidos por influir en el crecimiento hipertrofico.

[000212] Los cardiomiocitos derivados de células ES resistentes a la puromicina se obtuvieron como se

describió en el Ejemplo 1 y se mantuvieron en cultivo en suspensión. El fenotipo hipertrófico se indujo mediante cultivo de las células durante 24 h en medio 199 (Invitrogen), seguido de tratamiento con endotelina-1 (ET-1) 100 nM o con fenilefrina (PE) 100 μ M y diversas sustancias de ensayo (Tabla 1). Posteriormente, el ARN se extrajo usando el kit RNeasy mini (Qiagen) seguido de análisis por RT-PCR para analizar la expresión del ANF y del BNP, dos genes regulados por aumento en cardiomiocitos con hipertrofia (véase anteriormente). Se sintetizó el ADNc y el ADNc de ANF y del BNP se amplificó mediante RT-PCR (24 ciclos de PCR). Los cebadores usados para la amplificación del ANF fueron los proporcionados en el ejemplo 2 y los cebadores para la amplificación del BNP fueron: directo 5'-CAGCTCTTGAAGGACCAAGG-3' (SEQ ID NO: 20) e inverso 5'-AGACCCAGGCAGAGTCAGAA-3' (SEQ ID NO: 21), temperatura de renaturalización de 56°C, producto resultante de PCR de 242 pb. El ADNc de la *gapdh* se amplificó para controlar la síntesis de ARN de entrada y ADNc como se describió en el Ejemplo 2. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se analizó la intensidad de las bandas usando el sistema BioDocAnalyze (Biometra).

[000213] Se determinaron los niveles de expresión del ANF y del BNP en muestras que se habían tratado con ET-1 o PE, respectivamente, y con un compuesto de ensayo (Tabla 1) respecto a los niveles de expresión de los dos genes en muestras que se habían estimulado con ET-1 o PE, respectivamente, pero que no se habían tratado con un compuesto de ensayo (estos niveles de expresión se establecieron como el 100%).

[000214] El prazosin es un antagonista alfa(1)-adrenérgico. Se demostró que bloquea la respuesta hipertrófica a la estimulación alfa(1)-adrenérgica en cardiomiocitos neonatales de rata (Barron y col., *Biochem J.* 371 (PT 1) (2003), 71-79) y en miocitos ventriculares de rata adulta (Xiao y col., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33 (2001), 779-787) y que evita el inicio del fenotipo de cardiomiopatía en un modelo de hámster (Sole y Liew, *Am. J. Cardiol.* 62 (1988), 20G-24G). El prazosin no tuvo efecto sobre la inducción de hipertrofia (medida mediante inducción del ANF) mediante tratamiento de cardiomiocitos con ET-1 (Barron y col., *Biochem. J.* 371 (PT 1) (2003), 71-79). Los resultados concuerdan con los datos mostrados en la Tabla 1 para el prazosin, demostrando la inhibición de la inducción del ANF y del BNP tras tratamiento con PE de cardiomiocitos derivados de células ES y la no inhibición de la inducción del ANF y del BNP tras estimulación con ET-1 de los cardiomiocitos.

[000215] El BQ-123 y el BQ-788 son bloqueadores selectivos de los receptores de endotelina A (ETA) y B (ETB), respectivamente. Como se esperaba, inhiben la inducción del ANF y del BNP tras estimulación con ET-1, pero no tras estimulación con PE (Tabla 1).

[000216] La nifedipina y el verapamil son antagonistas de los canales de Ca^{2+} que se han usado para el tratamiento de la hipertensión y cardiomiopatía hipertrófica, entre otros trastornos, en seres humanos. Tras la estimulación con ET-1 de los cardiomiocitos, ambos compuestos inhibían la regulación por aumento del BNP, pero no la regulación por aumento del ANF. Tras estimulación con PE, se inhibió la regulación por aumento del ANF y del BNP con la nifedipina así como con el verapamil (Tabla 1). Esto es compatible con informes anteriores (Sole y Liew, *Am. J. Cardiol.* 62 (1988), 20G-24G; Pignier y col., *Receptors Channels.* 7 (2000), 173-187; Lubic y col., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27 (1995), 917-925).

[000217] La proteína fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina, calcineurina, se ha implicado como un mediador esencial de la hipertrofia cardíaca (Wilkins y Molkentin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004), 1178-1191). La calcineurina regula la actividad de varias dianas en la dirección 3', incluyendo los factores de transcripción NFAT, MEF2 y NF-kappaB y el factor apoptótico Bad (Pu y col., *Circ. Res.* 92 (2003), 725-731). La ciclosporina A es un inhibidor de la calcineurina y puede evitar la hipertrofia cardíaca en cardiomiocitos cultivados y en modelos de animales transgénicos (Zhang, *Cardiovasc. Res.* 53 (2002), 294-303). En cardiomiocitos derivados de células ES la ciclosporina A inhibe la regulación por aumento de la expresión del ANF y del BNP tras tratamiento de cardiomiocitos con ET-1, así como con PE (Tabla 1).

[000218] El inhibidor de la proteína cinasa C estaurosporina se demostró que bloqueaba las respuestas hipertróficas de cardiomiocitos en miocitos cardíacos de rata neonatales inducidas con ET-1 (Wu y col., *Sheng Li Xue Bao.* 150 (1998), 87-93) y con PE (Gaughan y col., *Am. J. Physiol.* 275 (1998), H577-H590). Según estos descubrimientos, la estaurosporina inhibía la regulación por aumento de la expresión del ANF y del BNP en cardiomiocitos derivados de células ES estimulados con ET-1 y con PE (Tabla 1).

[000219] En resumen, los datos proporcionados en la Tabla 1 demuestran que los compuestos ensayados interfieren con el fenotipo hipertrófico inducido de los cardiomiocitos derivados de células ES de forma que son coherentes con los datos publicados sobre animales experimentales con cardiopatía o sobre cardiomiocitos hipertróficos aislados *ex vivo*. Por tanto, estos cardiomiocitos derivados de células ES que se pueden haber inducido *in vitro* para obtener un fenotipo hipertrófico son adecuados para uso en un sistema de descubrimiento de fármacos que tiene como objetivo fármacos que mejoran la hipertrofia patológica de cardiomiocitos en la cardiopatía.

Tabla 1: Interferencia de compuestos con la hipertrofia de cardiomiocitos derivados de células ES.

Compuesto	Modo de acción	Concentración	Estímulos	Inducción de programa de genes hipertróficos	
				Expresión del ANF	Expresión del BNP
Prazosin	antagonista α_1 -adrenérgico	10 μ M	ET-1	100% (sin efecto)	100% (sin efecto)
			PE	40 %	40 %
BQ123	Bloqueador del receptor ETA	1 μ M	ET-1	50 %	60 %
			PE	100% (sin efecto)	100% (sin efecto)
BQ788	Bloqueador del receptor ETB	1 μ M	ET-1	70 %	70 %
			PE	100% (sin efecto)	100% (sin efecto)
Nifedipina	Bloqueador del canal de Ca^{2+}	100 nM	ET-1	100% (sin efecto)	10 %
			PE	20 %	20 %
Verapamil	Bloqueador del canal de Ca^{2+}	1 μ M	ET-1	100% (sin efecto)	30 %
			PE	40 %	20 %
Ciclosporina A	Inhibidor de calcineurina	1 μ g/ml	ET-1	70 %	50 %
			PE	70 %	70 %
Estaurosporina	Inhibidor de PKC	100 nM	ET-1	30 %	30 %
			PE	30 %	30 %

5 **[000220]** Los cardiomiocitos derivados de células ES se estimularon bien con endotelina-1 (ET-1) 100 nM o bien con fenilefrina (PE) 100 μ M en presencia de los compuestos indicados. Tras 24 horas se analizó la expresión de ARNm del ANF y del BNP mediante RT-PCR. Se determinaron los niveles de expresión del ANF y del BNP respecto a los niveles de expresión de los dos genes en muestras de control que se habían estimulado con ET-1 o PE pero que no se habían tratado con un compuesto de ensayo (estos niveles de expresión se establecieron como el 100%).

10 **[000221]** Se entenderá que las composiciones y procedimientos proporcionados en la descripción se pueden modificar de manera eficaz por los expertos en la materia sin apartarse del espíritu de la invención representada en las reivindicaciones siguientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 **[000222]**
 <110> Axiogenesis AG
 <120> Ensayo para el descubrimiento de fármacos basado en células diferenciadas in vitro
 <130> AX02A29/P-WO
 <150> EP04011214.6
 <151> 11-05-2004
 20 <160> 21
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 34
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> (1)..(34)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 1
 ggactagtcc agccacatg tccgagccca aggc 34
 <210> 2
 35 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 40 <220>
 <221> fuente

<222> (1)..(49)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 2
 ataagaatgc ggccgctaaa ctattcagtt tctgatgact tcctccgg 49
 5 <210> 3
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(17)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 15 <400> 3
 caccagaaat gacagac 17
 <210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 25 <222> (1)..(17)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 4
 aaaggacagt gggagtg 17
 <210> 5
 30 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 35 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(17)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 5
 40 cactcgctac ctcttct 17
 <210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(17)
 50 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 6
 tcgtacttca aactgc 17
 <210> 7
 <211> 17
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 60 <221> fuente
 <222> (1)..(17)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 7
 aaatgttctt gactctt 17

<210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(18)
 10 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 8
 cctcaccccc tggcttgt 18
 <210> 9
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 20 <221> fuente
 <222> (1)..(18)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 9
 ttccagcctg ccctcctt 18
 25 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(19)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 35 <400> 10
 caaggacgac ggcaactac 19
 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 45 <222> (1)..(18)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 11
 cgcttctcgt tgggtct 18
 <210> 12
 <211> 18
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 55 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(18)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 12
 60 ctgctccgac gatgaact 18
 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 5 <222> (1)..(18)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 13
 aaaggacagt gggagtgg 18
 <210> 14
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(19)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 14
 20 ctccttctcc atcaccctg 19
 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(19)
 30 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 15
 tttcctcctt ggctgttat 19
 <210> 16
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 40 <221> fuente
 <222> (1)..(20)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 16
 45 ggttcctac cccaatgtg 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(20)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 55 <400> 17
 cttgctcagt gtccttgctg 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente

<222> (1)..(20)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 18
 cagctcttga aggaccaagg 20
 5 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(20)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 15 <400> 19
 agaccaggc agagtcagaa 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <220>
 <221> fuente
 25 <222> (1)..(20)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 20
 cagctcttga aggaccaagg 20
 <210> 21
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 35 <220>
 <221> fuente
 <222> (1)..(20)
 <213> Descripción de secuencia artificial: Cebador
 <400> 21
 40 agaccaggc agagtcagaa 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para identificar y/u obtener un fármaco para la mejora o tratamiento de una enfermedad o para determinar la toxicidad de un compuesto que comprende:
- 5 (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende una célula diferenciada *in vitro* con una sustancia de ensayo que se va a cribar, en el que en dicha célula se induce la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula de una célula, tejido u órgano enfermos; y
- (b) determinar un cambio sensible del fenotipo en dicha muestra de ensayo, en el que un cambio sensible
- 10 (i) que evita o retrasa el inicio o la progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de un fármaco útil; y
- (ii) que potencia el inicio o progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de la toxicidad del compuesto; siempre que dicha célula no provenga de un embrión humano.
2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células diferenciadas *in vitro* proceden de células pluripotentes o multipotentes.
3. Procedimiento de la reivindicación 2, en el que dichas células pluripotentes o multipotentes proceden de ratón o de rata.
- 20 4. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha célula diferenciada *in vitro* comprende un gen marcador seleccionable unido de manera operable con una secuencia reguladora específica de un tipo de célula y un gen indicador unido de manera operable con una secuencia reguladora específica de un tipo de célula.
- 25 5. Procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho marcador seleccionable confiere resistencia a la puomicina y/o dicho indicador se selecciona de diferentes versiones coloreadas de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP).
- 30 6. Procedimiento de la reivindicación 4 ó 5, en el que dicha secuencia reguladora específica de un tipo de célula del gen indicador es básicamente la misma que dicha secuencia reguladora específica de un tipo de célula del gen marcador.
7. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha célula diferenciada *in vitro* está presente en un cuerpo embrioide (EB).
- 35 8. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho fenotipo incluye un parámetro seleccionado del grupo constituido por tamaño celular, forma celular, síntesis proteica, organización de filamento de actina/miosina, activación del patrón de expresión génica característico de células cardiomiopáticas y/o activación de genes que se expresan durante el desarrollo embrionario temprano.
- 40 9. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho fenotipo se induce mediante el cultivo de dicha célula diferenciada *in vitro* en presencia de un compuesto fisiológicamente activo.
- 45 10. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es un agonista hipertrófico seleccionado del grupo constituido por endotelina-1, angiotensina II o un agonista α 1-adrenérgico.
11. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha célula diferenciada *in vitro* se modifica mediante ingeniería genética para expresar dicho fenotipo y/o para expresar o suprimir un gen que codifica una potencial diana del fármaco.
- 50 12. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende medir la actividad eléctrica a través de un grupo de electrodos y, opcionalmente, parámetros adicionales, preferiblemente, en los que se analizan uno cualquiera o todos de los parámetros siguientes:
- 55 (i) canales de Na^+ ;
- (ii) canales de $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$;
- (iii) canales de K^+ ;
- (iv) amplitud y/o duración del potencial de campo (FDP);
- (v) cronotropismo de células cardiacas o periodos de ráfagas de células neuronales;
- (vi) Arritmias, fenómenos tipo EAD;
- 60 (vii) valor de pH;
- (viii) presión parcial de oxígeno (pO_2);
- (ix) detención del latido; y
- (x) análisis de contractibilidad con disociación AV, SIN efectos y/o cambios morfológicos.

- 5 13. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha etapa de puesta en contacto incluye adicionalmente poner en contacto dicha muestra de ensayo con al menos una segunda sustancia de ensayo en presencia de dicha primera sustancia de ensayo y/o en el que un compuesto que se sabe que activa o inhibe el proceso de diferenciación y/o la formación de estructura tisular se añade al medio de cultivo.
- 10 14. Uso de un kit o composición en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que contiene una célula multipotente o pluripotente, siempre que la célula no sea un embriocito indiferenciado humano o un derivado del mismo o una célula germinal embrionaria humana o un derivado de la misma, una célula diferenciada *in vitro*, medio de cultivo, moléculas de ácido nucleico recombinante y/o compuestos patrón.
- 15 15. Uso de un equipo en el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para analizar un parámetro del fenotipo.
17. Uso de una célula diferenciada *in vitro* en la que se induce la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido según un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la validación de una diana, descubrimiento de un fármaco u obtención de un perfil farmacocinético o farmacológico.
- 20 17. Procedimiento de identificación y/o obtención de un gen o producto génico implicado en una enfermedad como la diana de un fármaco que comprende obtener el perfil de la expresión de una célula diferenciada *in vitro* como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 antes y después de la inducción de dicho fenotipo, en el que la expresión diferencial de un gen o producto génico es indicativa de una potencial diana de un fármaco.
- 25 18. Procedimiento de la reivindicación 17, que comprende además clonar el gen identificado o un ADNc correspondiente o fragmento del mismo.
- 30 19. Procedimiento de validación de una potencial diana de un fármaco que comprende
(a) modificar la expresión de un gen diana y/o actividad del producto génico diana en una célula diferenciada *in vitro* como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 antes, durante o después de que en dicha célula se induzca la expresión de un fenotipo de enfermedad predefinido que básicamente corresponde a un fenotipo de una célula de una célula, tejido u órgano enfermos; y
(b) determinar un cambio sensible del fenotipo de dicha célula, en el que un cambio sensible
(i) que evita o retrasa el inicio o la progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de que se activará una diana de un fármaco; y
(ii) que potencia el inicio o progresión del fenotipo de enfermedad es indicativo de que se inhibirá una
35 diana de un fármaco para el tratamiento de la enfermedad.

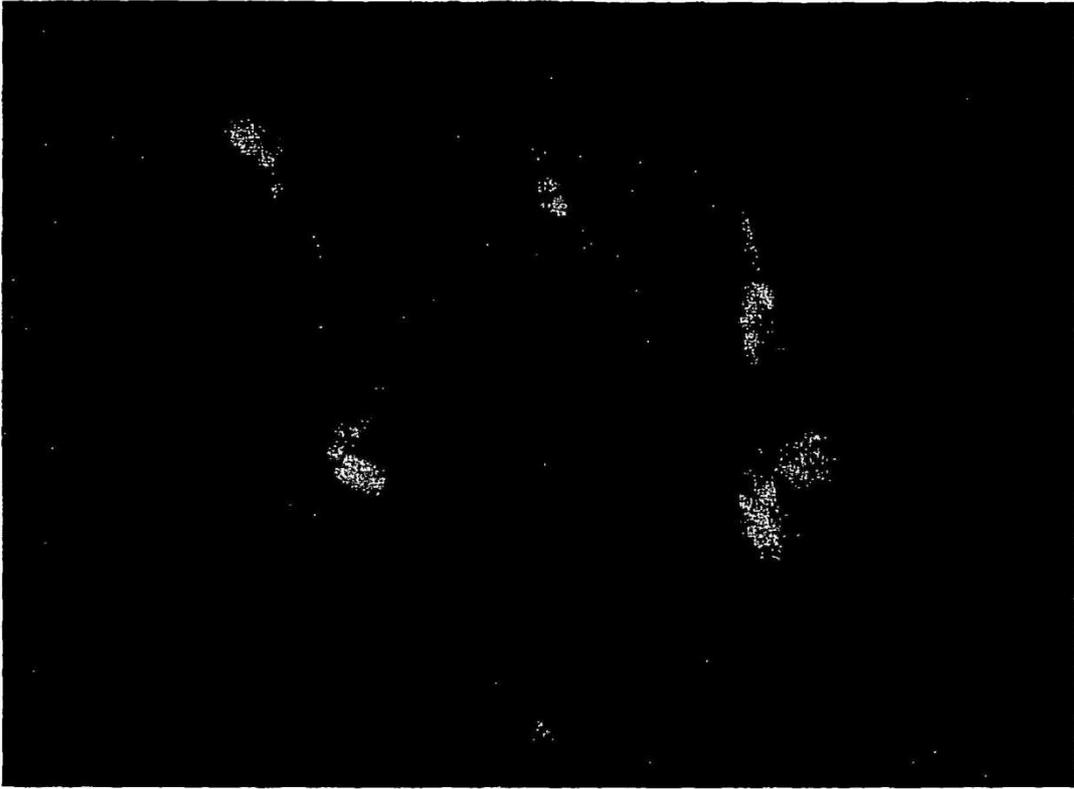


Fig. 1A

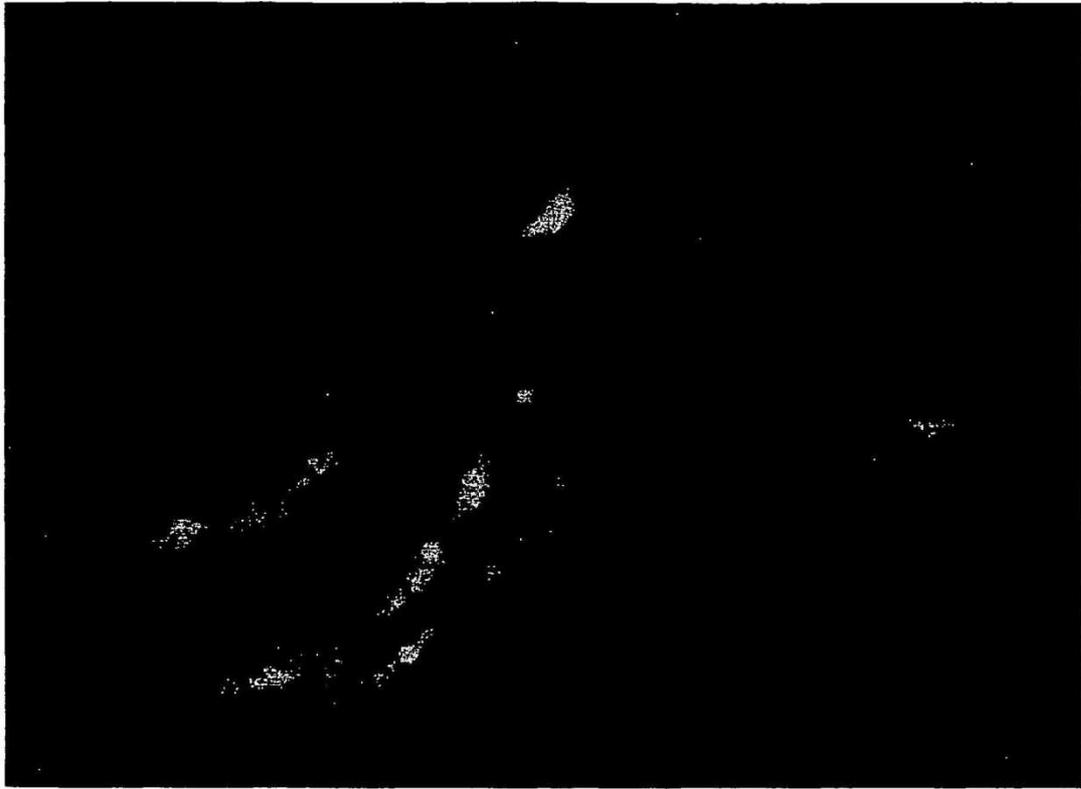


Fig. 1B

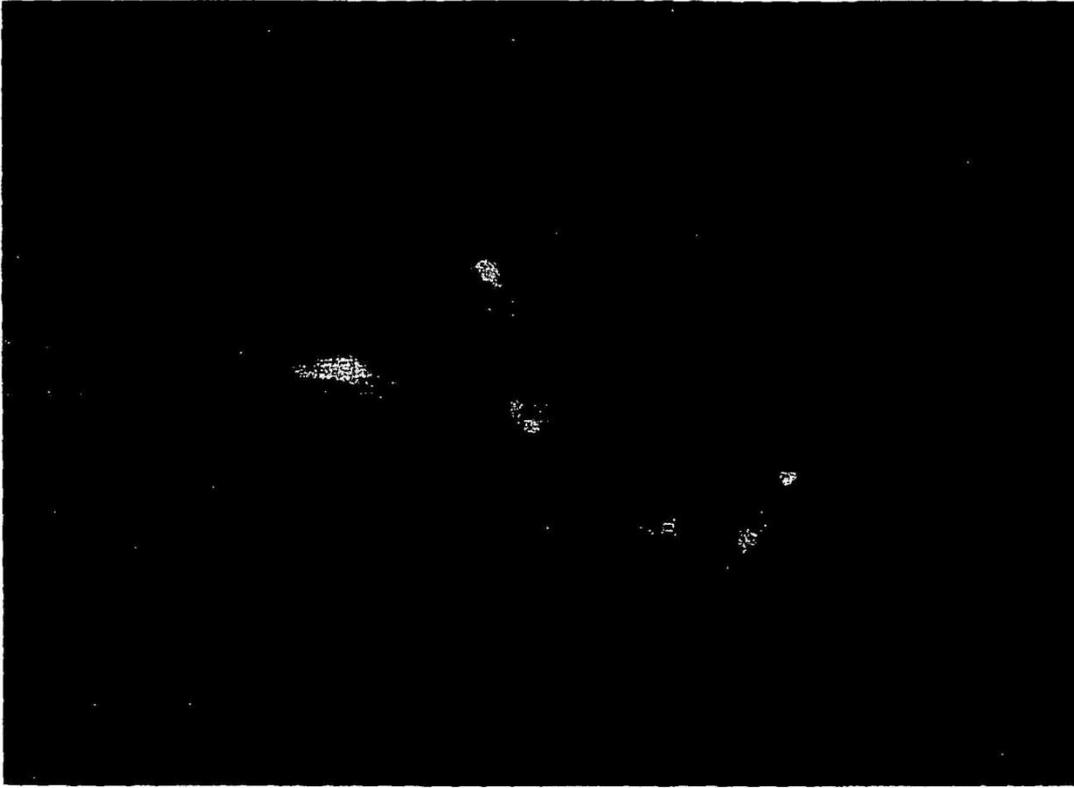


Fig. 1C

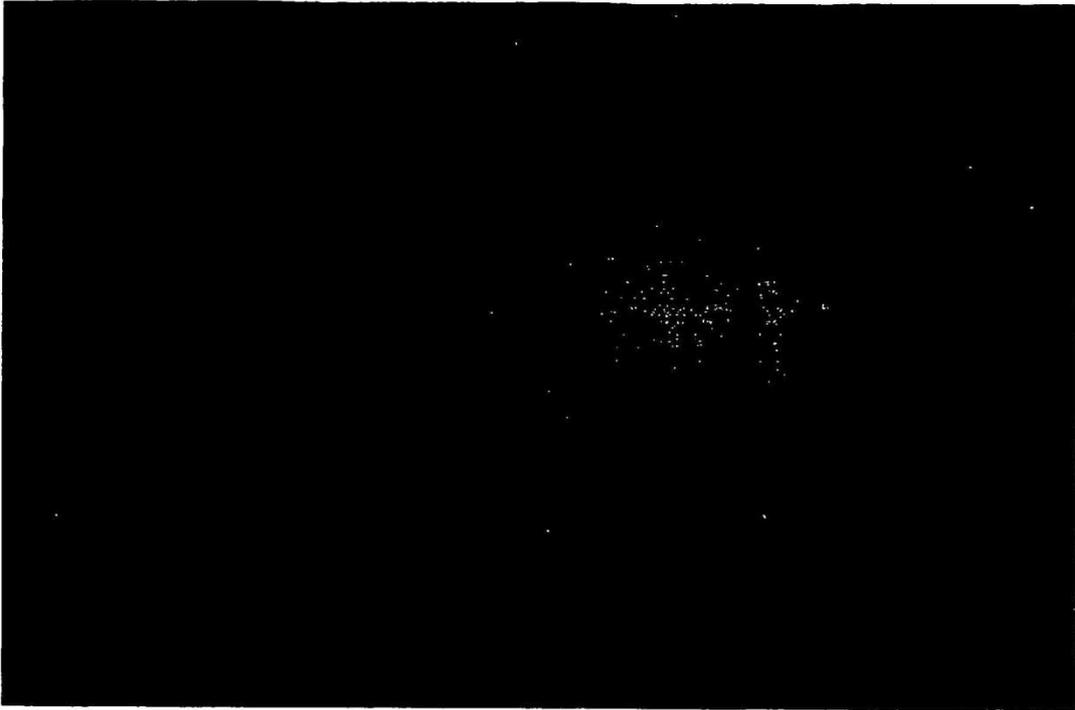


Fig. 2A



Fig. 2B

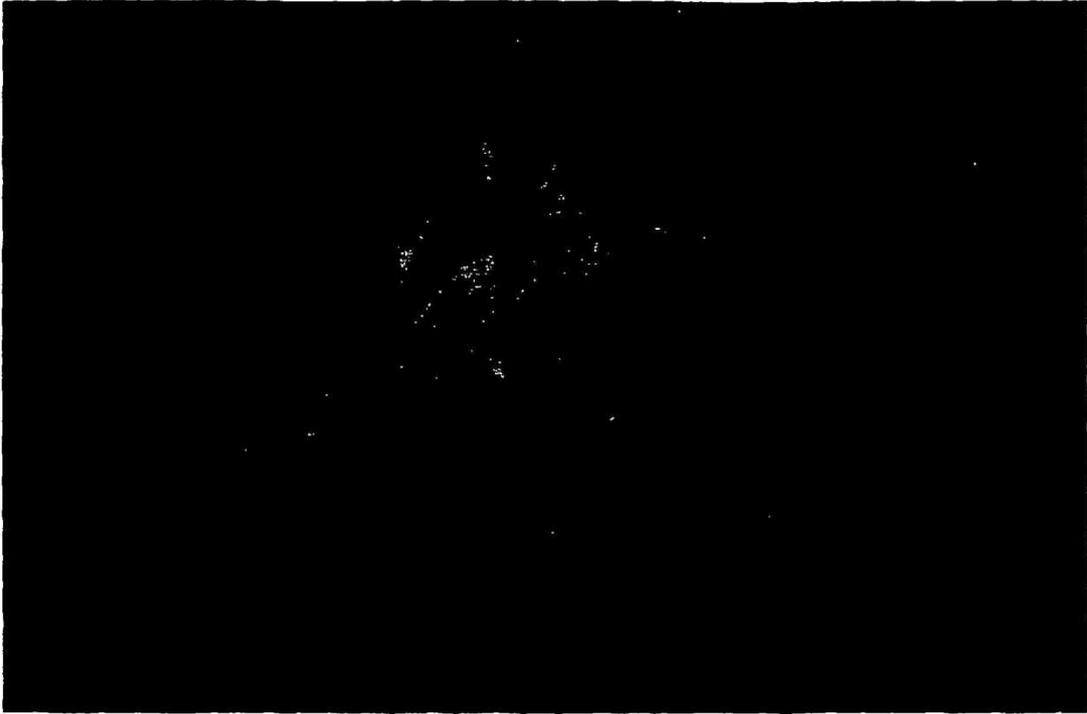


Fig. 2C

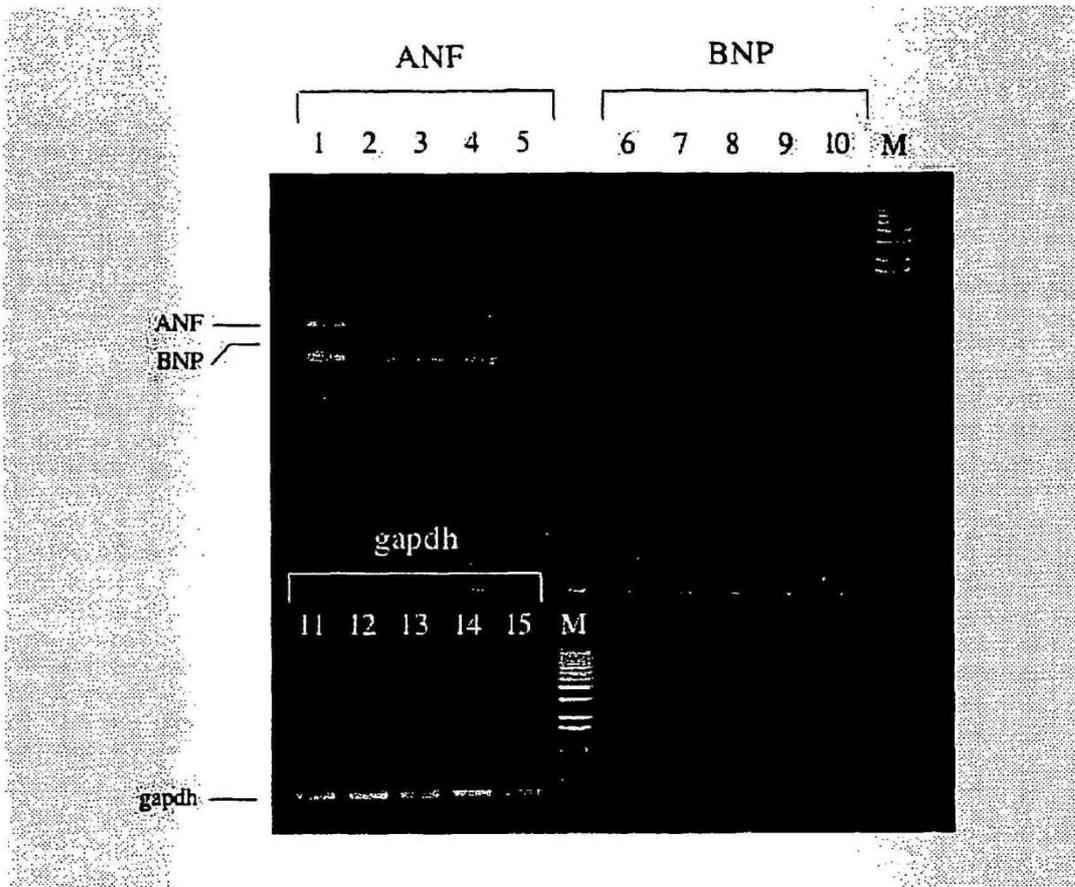


Fig. 3

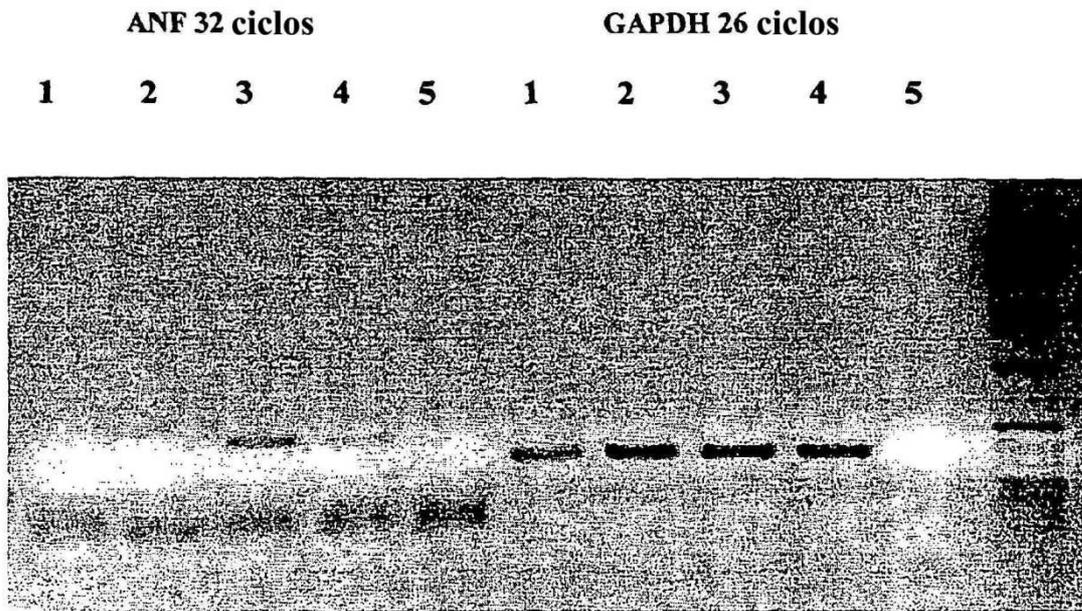


Fig. 4