

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 086**

51 Int. Cl.:

C12N 15/06 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2006 PCT/GB2006/004483**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2007 WO07063316**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2006 E 06808713 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 1974032**

54 Título: **Método para la identificación de un modulador de una señalización celular**

30 Prioridad:

30.11.2005 GB 0526664

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

15.06.2017

73 Titular/es:

PROGENITOR LABS LIMITED (100.0%)

**5 New Street Square
London, EC4A 3TW , GB**

72 Inventor/es:

CHOO, YEN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 617 086 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

Método para la identificación de un modulador de una señalización celular

5 Campo de la invención

La descripción se relaciona con un método para la identificación de un modulador de una vía de señalización celular, particularmente un método para la identificación de un modulador de una vía de señalización celular que desencadena la diferenciación en las células. Los moduladores pueden identificarse mediante la exposición de las células progenitoras a candidatos de moduladores. En un aspecto, las células progenitoras son células madre multipotentes o unipotententes que se aíslan en varias fases de diferenciación, y se cultivan, además, junto con un modulador potencial del proceso de diferenciación que actúa mediante estimulación o inhibición del efecto de vías de señalización celular sobre la diferenciación.

15 Antecedentes de la invención

El campo de la medicina regenerativa sostiene la promesa realista de la regeneración de tejidos y órganos dañados *in vivo*, en pacientes con afecciones tales como enfermedad cardiovascular, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad musculoesquelética, enfermedad del hígado o diabetes. Las técnicas para la regeneración de tejidos dañados implican tanto reparar el tejido enfermo existente *in vivo* con el uso de fármacos regenerativos como mediante reemplazo de tal tejido con el uso de células preparadas primero *in vitro*, con o sin el uso de fármacos regenerativos y después se trasplantan *in vivo*.

En cualquier caso, las metas de la medicina regenerativa pueden solamente materializarse si pueden identificarse genes específicos, factores o moduladores que controlan las vías de señalización celular y los procesos celulares derivados que ellos regulan. Se piensa que la diferenciación de células madre *in vitro* por ejemplo, puede proporcionar una fuente de reemplazo de células para el trasplante. La pluripotencia y plasticidad de las células madre les permite comprometerse en un tratamiento de seguimiento particular para un tipo de células con ciertas condiciones de cultivo. Sin embargo, un enfoque de este tipo se basa en la identificación previa de los factores o moduladores que controlan los eventos celulares y moleculares de diferenciación de linajes. El uso de estos factores o moduladores de células madre *ex vivo* podría reducir la probabilidad de diferenciación espontánea de las células madre en linajes divergentes tras el trasplante, así como también reducir el riesgo de formación de teratoma en el caso de las células madre embrionarias.

Tales factores o moduladores podrían, además, formar las bases de las terapias que buscan movilizar las células madre endógenas *in vivo*, o para activar su diferenciación en un tipo celular que puede amplificar, reparar, restaurar, reemplazar o, de cualquier otra manera, beneficiar a un tejido dañado. Un ejemplo de un factor que afecta a la diferenciación celular y se usa en terapia es la eritropoyetina (EPO). EPO es un factor proteico de origen natural que promueve la diferenciación de precursores hematopoyéticos en los eritrocitos. La EPO recombinante se usa para tratar la anemia y tiene un mercado global de aproximadamente 10 mil millones de dólares.

Adicionalmente a las moléculas o factores de origen natural, es posible afectar la diferenciación de las células por medio de moduladores sintéticos de vías de señalización, particularmente moduladores de las vías que controlan la diferenciación. SB-497115 es un fármaco de molécula pequeña que se desarrolla por GSK que imita la actividad de trombopoyetina (TPO), un factor proteico que promueve el crecimiento y la producción de las plaquetas de la sangre. El fármaco podría usarse para tratar la trombocitopenia: la incapacidad de producir plaquetas, que se requieren críticamente como componentes del proceso de coagulación durante el sangrado. Se estima que la oportunidad de mercado es de aproximadamente 4 a 5 mil millones de dólares.

Aunque los fármacos regenerativos tales como EPO o SB-497115 actúan sobre las células madre, se ha propuesto un método general para el descubrimiento de fármacos regenerativos con el uso de células madre, particularmente células madre embrionarias o fetales.

Intentos primitivos en el uso de células madre en el descubrimiento de fármacos han implicado experimentos en los que células madre embrionarias pluripotentes, células madre adultas o líneas celulares de autorrenovación se han usado en muestreos fenotípicos basados en células y específicos de vías de productos naturales o compuestos sintéticos para descubrir agentes capaces de ocasionar la diferenciación de estas células (ver revisión por Ding & Shultz (2004) *Nature Biotechnology* 22: 833-840). Una de las razones para el uso de estas células es que ellas pueden amplificarse fácilmente para producir las cantidades necesarias para un muestreo. Sin embargo los enfoques de la técnica anterior, en los que se usan células madre o líneas de células no diferenciadas, de autorrenovación, se encuentran deficientes como metodologías de descubrimiento de fármacos por un número de razones que se discuten a continuación.

En primer lugar, los tipos de células usados en la técnica anterior (particularmente, las células y líneas celulares ES) no pueden ser objetivos pertinentes fisiológicamente adecuados para la intervención farmacológica *in vivo*. Por ejemplo, mientras que un factor que es capaz de causar la diferenciación de células ES en, por ejemplo, cardiomiocitos (Wu y otros, *J Am Chem Soc.* 2004:126(6):1590-1) puede usarse en permitir la creación de los cardiomiocitos *in vitro* a partir de

células ES, la célula ES no está presente en el adulto y cualquier agente que tiene actividad específicamente sobre la célula ES probablemente no actuaría como una medicina regenerativa *in vivo*.

En segundo lugar, los tipos de células usados en la técnica anterior (particularmente las células ES y células madre adultas de autorrenovación) se hallan demasiado distantes corriente arriba del linaje de células objetivo en la vía de desarrollo para experimentar la diferenciación dirigida hacia este linaje, en respuesta a una aplicación única de un único agente. Por ejemplo se sabe que la aplicación cronometrada de numerosos cócteles de factores en serie se requieren para diferenciar células ES en linajes específicos, particularmente los que se especifican relativamente tarde en el desarrollo, como resultado de un proceso relativamente complicado de la especificación de tejidos.

En tercer lugar, los tipos de células usados en la técnica anterior (particularmente células madre adultas primarias) pueden ser difíciles de obtener en cantidades suficientes para llevar a cabo la selección de alto rendimiento de fármacos a gran escala.

Finalmente, los tipos de células usados en la técnica anterior (particularmente células madre adultas primarias) puede exhibir efectos muy variables en respuesta a los fármacos, en dependencia de la fuente o el método de aislamiento y preparación.

El documento WO2004/03136 describe métodos y vías de señalización celular que permiten la diferenciación de las células - tales como las células madre. En la técnica descrita en WO2004/031369 las células se cultivan en etapas múltiples de cultivo bajo una pluralidad de condiciones para modular las vías celulares y el método proporciona un medio de determinar el efecto de varios regímenes de etapas múltiples de cultivo sobre los procesos celulares, tal como la diferenciación.

Los enfoques existentes para el descubrimiento de fármacos regenerativos son subóptimos y existe una necesidad de mejores métodos para descubrir tales fármacos. La presente invención ofrece soluciones a estos problemas y proporciona mejores métodos para el descubrimiento de fármacos -tales como fármacos regenerativos.

Resumen de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que es posible estancar células madre en una vía de diferenciación, lo que aísla así células de otro tipo adecuadas para la selección. En una modalidad, esto se logra mediante al obtener células de un primer tipo y determinar un protocolo de diferenciación que conduce a la aparición de un fenotipo objetivo dado de interés a través de una célula progenitora, y opcionalmente, modificar aún más este protocolo, típicamente, mediante la variación de los medios de cultivo celular, de manera que el proceso de diferenciación se estanque en una fase en la que las células de otro tipo, preferentemente las células progenitoras, estén presentes. La identidad de las células del segundo tipo, por ejemplo, células progenitoras no se necesita conocer, pero su existencia en la preparación puede inferirse a partir del hecho de que el fenotipo de interés aparecerá si el protocolo de diferenciación original, se sigue hasta la terminación. Así, en una modalidad, los métodos descritos en la presente descripción, pueden usarse para producir progenitores de desarrollo de células cuyos progenitores *in vivo* no se conocen aún.

Una forma de producción de tales células es usar el método del documento WO2004/031369 para descubrir una serie de etapas de cultivo que conducen a la diferenciación y posteriormente modificación o truncado del proceso lo que conduce al aislamiento de células progenitoras. La invención reconoce que mediante exposición secuencial a los agentes seleccionados, las células pueden aislarse en un estado parcialmente diferenciado que es sustancialmente idéntico a la agrupación de progenitores *in vivo*, y después seleccionarse para factores que inducen la diferenciación adicional.

La presente invención reconoce, además, que los ensayos de cribado de descubrimiento de fármacos regenerativos son más propensos a identificar candidatos farmacológicos efectivos, si una célula progenitora fisiológicamente relevante, se usa en un cribado basado en células de productos naturales o compuestos sintéticos. Las células progenitoras fisiológicamente relevantes tienen menos potencial de desarrollo en comparación con células madre embrionarias o adultas de autorrenovación y se encuentran corriente abajo en la vía de desarrollo de estas células multipotentes. Por ejemplo, el tipo de célula objetivo para EPO en el tratamiento clínico de la anemia no es la célula madre embrionaria, ni la célula madre hematopoyética adulta de autorrenovación, sino más bien una célula progenitora de eritrocitos más comprometida que se encuentra más allá a lo largo de la vía de desarrollo y cuyo potencial de desarrollo es mucho más restringido (Fisher, Exp. Biol Med 2003 enero;228(1):1-14). Si esta población progenitora estuviera disponible para su uso en un ensayo de cribado de descubrimiento de fármacos, el efecto de la EPO sobre la regeneración de los eritrocitos sería fácilmente evidente. Por otro lado, este efecto regenerativo de la EPO no es tan fácilmente evidente si se usan células ES no diferenciadas en un cribado, incluso cuando estas células pueden diferenciarse en eritrocitos con el uso de protocolos adecuados. Por lo tanto una célula progenitora fisiológicamente relevante, en lugar de una célula madre multipotente de autorrenovación, debe usarse en un cribado de fármacos para identificar fármacos regenerativos.

Sin embargo, un problema importante del uso de poblaciones progenitoras es que son extremadamente difíciles de conseguir, tienen capacidad de amplificación limitada y en algunos casos están completamente sin caracterizar. Por ejemplo, ciertas progenitoras neurales son bien conocidas pero residen en el cerebro vivo y así son difíciles de conseguir para los ensayos de cribado de fármacos. Además, el hígado es un órgano capaz de rápida regeneración *in vitro*, y las

biopsias de hígado son relativamente más fáciles de conseguir en comparación con biopsias de cerebro, pero la población de células progenitoras responsables de la regeneración del hígado todavía no se ha identificado concluyentemente, y por lo tanto no puede aislarse, cultivarse y usarse en ensayos de cribado de fármacos.

5 La presente descripción reconoce, además, que las células progenitoras fisiológicamente relevantes adecuadas para ensayos de cribado de descubrimiento de fármacos regenerativos, pueden derivarse de células madre embrionarias o adultas de autorrenovación, si puede hacerse que estas células se diferencien hasta, pero no más allá, de la fase relevante de la progenitora. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica para la mejora de técnicas para aislar células parcialmente diferenciadas para el cribado, posteriormente, de factores que podrían usarse para modular su diferenciación.

10 La presente descripción involucra métodos de aislamiento de tipos de células parcialmente diferenciadas que comprenden células progenitoras fisiológicamente relevantes. En una modalidad, esto se logra al obtener células madre y someterlas a las técnicas descritas en el documento WO2004/031369 para descubrir un protocolo de diferenciación, y modificar aún más este protocolo, de manera que, el proceso de diferenciación se estanque en, o no avance más allá, de una fase en la que las células progenitoras objetivo estén presentes. En otra modalidad, esto implica aislarlas a partir de una agrupación de células madre adultas, desarrollar el feto o animal en varias fases de desarrollo y, opcionalmente, modificarlas de manera que puedan amplificarse *in vitro*. Adicionalmente, estas células progenitoras pueden usarse en ensayos en los que se seleccionan productos naturales y moduladores de molécula pequeña candidatos de la señalización celular para identificar agentes que afectan la señalización celular en las células progenitoras, lo que causa, por ejemplo, movilización, amplificación o diferenciación, y que puedan desarrollarse después en medicinas regenerativas.

Aspectos y modalidades de la presente invención

25 En un primer aspecto, se proporciona un método para identificar un modulador potencial de una vía de señalización celular, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una célula de un primer tipo, en donde dicho primer tipo de célula puede diferenciarse en un segundo tipo de célula, a través de una célula progenitora, mediante la exposición secuencialmente de dicho primer tipo de célula a una o más, preferentemente dos o más condiciones de reacción; (b) añadir a o, reemplazar al menos, una de dichas dos o más condiciones de reacción a la que la célula progenitora se ha expuesto, con la exposición a una o más condiciones de reacción diferentes que comprenden dicho modulador potencial; y (c) controlar la diferenciación del primer tipo de célula para determinar la formación del segundo tipo de célula.

30 En un aspecto adicional, se proporciona un método para identificar un modulador potencial de una vía de señalización celular, que comprende las etapas de; (a) proporcionar una célula de un primer tipo de célula, en donde dicho primer tipo de célula puede diferenciarse en un segundo tipo de célula a través de una célula progenitora mediante exposición, secuencialmente, de dicho primer tipo de célula a dos o más condiciones de reacción; (b) añadir a o, reemplazar al menos, una de dichas dos o más condiciones de reacción a la que la célula progenitora se ha expuesto, con la exposición a una o más condiciones de reacción diferentes que comprenden dicho modulador potencial; (c) controlar la diferenciación del primer tipo de célula para determinar la formación del segundo tipo de célula, en donde la diferenciación de las células en el segundo tipo de célula es indicativo de que dicho modulador potencial modula la vía de diferenciación celular.

35 La descripción reconoce, además, que por derivación de un organismo en un estado temprano del desarrollo, las células pueden aislarse en un estado parcialmente diferenciado y, opcionalmente, amplificarse, opcionalmente aún más diferenciadas, y después seleccionarse para moduladores que inducen la diferenciación en un linaje o fenotipo de células objetivo.

Por consiguiente en una modalidad, se obtiene el primer tipo de célula u obtenible a partir de un embrión o feto y, opcionalmente, se modifica para permitir la amplificación.

50 En una modalidad, la célula progenitora se deriva *in vitro* a partir de un primer tipo de células por la exposición (por ejemplo, la exposición secuencial) a una o más (por ejemplo, dos o más) condiciones de reacción.

En otra modalidad, las células se controlan para la muerte celular en vez de la diferenciación celular. Por consiguiente, el cribado puede ser un cribado para la toxicidad.

55 En una modalidad, las condiciones de reacción comprenden un cribado de moduladores potenciales (por ejemplo, un cribado de al menos 100 moduladores potenciales, al menos 1000 moduladores potenciales, o al menos 10,000 moduladores potenciales).

60 En otra modalidad, el primer tipo de célula es una célula madre de autorrenovación.

La invención emplea unidades de células. Tales unidades pueden ser células individuales, pero son ventajosamente colonias de dos o más células, que se organizan en una forma tal que son resistentes a la interrupción incluso durante procedimientos de cultivo de agrupaciones divididas. Por ejemplo, las células pueden cultivarse sobre un sustrato sólido, tal como perlas, como se describe con más detalle más abajo. En la presente invención las unidades de células pueden aislarse en cualquier fase del proceso de diferenciación. que se desencadena mediante adición secuencial de agentes en

el medio de cultivo. En consecuencia, se proporciona un método para determinar el efecto de una pluralidad de condiciones de cultivo sobre una célula como se describió anteriormente, en donde las unidades celulares que están parcialmente diferenciadas se aíslan después y se usan en el método descrito para identificar el efecto de moduladores sobre la vía de señalización celular.

Típicamente, las unidades celulares usadas son microportadores que son suficientemente pequeños para transferirse a un sistema de selección HTS en fase líquida y sin desorganización sustancial de la unidad celular. Este sistema facilita en gran medida la producción de cantidades de células diferenciadas para la selección, y, además, la configuración del ensayo HTS. Particularmente esto, además, permite el uso de células para HTS sin ninguna desorganización previa de las células, tales como mediante digestión proteolítica, para permitir la transferencia de las células de un recipiente a otro, lo que es ventajoso ya que tales procesos pueden afectar el estado de diferenciación inmediata o la capacidad de diferenciación de las células corriente abajo. Además, permite la transferencia automatizada de células por medio de sistemas robóticos.

Así una ventaja importante de usar unidades de células - por ejemplo unidades de células que crecen en microportadores para preparar el material celular antes de la selección - es que conserva el nicho celular que ha surgido en el proceso de preparación y que puede ser importante para el cribado de la diferenciación corriente abajo. Si el material celular se preparó en la forma convencional y se desorganizó para repartir dentro de pocillos, entonces se desorganizaría el nicho. Si por el contrario se preparó el material celular para el cribado en pocillos separados, entonces la variación de pocillo a pocillo resultante en la preparación haría la selección de fármacos difícil de interpretar.

Ventajosamente, en ciertas aplicaciones las unidades celulares pueden etiquetarse. El etiquetado permite el seguimiento de los condiciones de cultivo a las que se han expuesto las células; así, cualquier unidad celular dada puede tener su etiqueta que se lee para determinar cómo se ha derivado de la agrupación o cultivo celular de partida. El etiquetado puede tomar cualquiera de la variedad de formas que incluyen etiquetas de ácidos nucleicos, etiquetas codificadas de radiofrecuencia, etiquetas de microesferas, etiquetas con códigos de barra, y codificación espacial de unidades celulares sobre una superficie o matriz.

La etiqueta puede seleccionarse del grupo que consiste en un virus, un oligonucleótido, un péptido, un compuesto fluorescente, una amina secundaria, un halocarbono, una mezcla de isótopos estables, un código de barras, una etiqueta óptica, una perla, un punto cuántico y una etiqueta codificante de radiofrecuencia. Dos o más etiquetas pueden seleccionarse a partir de este grupo y se usan en combinación para etiquetar una unidad celular, por ejemplo una perla que comprende compuestos fluorescentes y/o puntos cuánticos. El etiquetado y etiquetas específicas que deben usarse con unidades celulares se discuten aún más en nuestra solicitud copendiente GB01517382.8.

Las células pueden cultivarse en unidades celulares, cada unidad celular que comprende una o más células. En otra modalidad, las unidades celulares son células individuales. La unidad celular puede comprender una o más células adherentes a o delimitadas mediante un sustrato sólido. En una modalidad adicional, el sustrato sólido es un microportador o perla. Aún en una modalidad adicional el sustrato sólido es un pocillo o barrera permeable al medio. Las condiciones de cultivo pueden ser medios a los que se expone la célula. Los medios pueden contener uno o más agentes específicos, que influyen en un proceso celular.

En una modalidad, las condiciones de reacción incluyen cualquier medio físico o químico en el que se aíslan las células y se manipulan, aunque adecuadamente la condición de reacción es una condición de cultivo a la que se exponen las células. Las condiciones de cultivo incluyen medios de crecimiento, los regímenes de temperatura, sustratos, las condiciones atmosféricas, la manipulación física de las células y similares. Los medios de crecimiento comprenden sustancias naturales y sintéticas que nutren y afectan a las células, que incluyen, pero sin limitarse a, medios basales, factores de crecimiento, nutrientes, tampones, productos químicos, fármacos y similares. Las condiciones de reacción pueden incluso comprender un cribado de moduladores potenciales de una vía de señalización celular.

La invención puede usarse para controlar la diferenciación de un primer tipo de célula en cualquier fase de desarrollo, pero los inventores reconocen que debido a su relativa facilidad de cultivo, la pluripotencia y el potencial terapéutico, las células madre pueden ser particularmente adecuadas como un primer tipo de célula. Así, en una modalidad, la descripción proporciona unos métodos como se describió anteriormente, en donde el primer tipo de célula es una célula que se ha estancado a lo largo de una vía de diferenciación entre una célula madre y un tipo de célula diferenciada.

En una modalidad, el tipo de célula es una célula primaria, línea celular o línea celular derivada de tumores. El tejido de origen del tipo de célula puede seleccionarse de un grupo que consiste en cerebro, corazón, hígado, pulmón, cabello, ojos, intestino, sangre, oído, riñón, piel, dientes, páncreas, músculos, huesos y la vasculatura.

En otra modalidad, se proporciona para el uso un tipo de célula parcialmente diferenciada o progenitora. Dicho tipo de célula puede aislarse a partir de un organismo o producirse a partir de células pluripotentes mediante el uso de un método de determinar el efecto del cultivo, condiciones sobre la diferenciación; y se somete además a un método de identificar el efecto de los moduladores en las vías de señalización celular que afectan a la diferenciación. El método de identificar el efecto de los moduladores en las vías de señalización celular que afectan la diferenciación puede implicar la selección de moduladores potenciales mediante el uso de las técnicas de descubrimiento de fármaco comúnmente empleadas por las

empresas farmacéuticas (Reinventing Drug Discovery, Executive Briefing, Accenture, 1997; High Performance Drug Discovery, Executive Briefing, Accenture, 2001).

En otra modalidad, se proporciona un método para la exposición de las células progenitoras o células parcialmente diferenciadas a un modulador potencial y después controlar el efecto del modulador en el proceso de diferenciación. En una modalidad, el modulador potencial es un inhibidor de una vía de señalización celular. En otra modalidad, el modulador potencial es un promotor de una vía de señalización celular. El efecto de un modulador para promover o inhibir las vías de señalización celular que afectan a la diferenciación, puede evaluarse mediante un ensayo adecuado, que incluye pero sin limitarse a controlar el fenotipo, la expresión de un gen indicador, el genotipo, la producción de moléculas, la viabilidad, cambios metabólicos o la capacidad proliferativa de las células.

La descripción proporciona un método para la obtención de células progenitoras o células parcialmente diferenciadas de los tejidos en los embriones y fetos en desarrollo, o por supuesto de adultos. A medida que se desarrollan los tejidos a través de las fases fetales y adultas, se desarrollan las células madre que se restringen progresivamente en la capacidad de desarrollo, al convertirse, finalmente, en células madre adultas. Así en cualquier punto en el desarrollo de un organismo, las células progenitoras pueden extirparse de los tejidos, por ejemplo del feto de un animal o un feto humano obtenido inmediatamente después de un aborto electivo. Por ejemplo, las células que comprenden los precursores de las células productoras de dopamina pueden aislarse de regiones específicas del sistema nervioso central en desarrollo del feto. Dado que las células derivadas de material fetal son escasas, puede ser necesario amplificar estas células. En este caso, es posible hacer esto sin afectar su estado de diferenciación mediante la transformación de estas células, por ejemplo con el uso de un oncogén tal como c-myc. Adecuadamente, la transformación es reversible y no conduce a la diferenciación de la célula progenitora. La descripción reconoce que el material de células madre fetales o adultas, puede requerir aún más diferenciación para producir células progenitoras, y esto puede lograrse mediante el método descrito más adelante para otras células madre tales como las células ES.

La descripción proporciona, además, un método para obtener células progenitoras o células parcialmente diferenciadas de líneas celulares pluripotentes, que incluyen, pero sin limitarse a, líneas de células madre embrionarias, mediante la determinación de un protocolo de diferenciación y la realización de este en parte. En este caso la población de células resultante comprenderá una o más células progenitoras: no es necesario saber qué proporción de las células en la población son células progenitoras, ni poder identificar estas, sin embargo, su presencia puede inferirse del hecho de que las células completamente diferenciadas se originarían de estas, si dicho protocolo de diferenciación se concluye (en lugar de estancarse).

Los protocolos de diferenciación implican, típicamente, someter las células a una serie temporal especificada de condiciones de cultivo apropiadas. Las células que originan las células progenitoras pueden inducirse a diferenciarse a lo largo de una vía de desarrollo deseada mediante el uso de este método de cultivo de células seriado. Las células pueden estancarse en cualquier fase del proceso de diferenciación con la obtención así, de las células progenitoras, al interrumpir o modificar la serie de condiciones de cultivo apropiadas. Por ejemplo, si un protocolo de diferenciación de 10 días que comprende una serie de cinco etapas de cultivo se requiere para diferenciar las células ES en macrófagos, entonces la realización por completo de solamente tres de las etapas en esta serie resultará en la diferenciación parcial de las células madre embrionarias a lo largo de ese linaje y permitirá el aislamiento de las células progenitoras de macrófagos.

El método descrito para la identificación de una pluralidad de condiciones de cultivo permite miles o millones de condiciones y reactivos de cultivo celular para probar, en un ensayo de alto rendimiento múltiple, para determinar las condiciones necesarias para lograr la diferenciación de las células.

En otro aspecto se proporciona un método para la identificación de moduladores de la señalización celular como se describió previamente, en donde una primera célula se diferencia en un segundo tipo de célula mediante la modulación de la señalización celular y/o la expresión de uno o más genes en la célula.

La señalización celular y/o la expresión de los genes de la célula pueden modularse mediante, por ejemplo, la adición de biomoléculas tales como factores, factores de crecimiento, morfógenos, hormonas, agonistas y antagonistas de receptores, lípidos, anticuerpos, fármacos y similares; o mediante la adición de fármacos sintéticos, productos químicos, moléculas pequeñas y similares. Adecuadamente, los moduladores anteriores se añaden en combinaciones, tales como a partir de un extracto de células, a partir de un cocultivo, en suero animal, o un cóctel preparado *in vitro*.

La señalización celular y/o la expresión de los genes de la célula pueden modularse, además, mediante transfección o transferir de otra manera, un gen en la célula de tal manera que se expresa o sobreexpresa en una forma temporal, inducida por ligando o permanente. Alternativamente, la expresión del gen endógeno puede alterarse, tal como por inserción dirigida de un potenciador o la administración de agentes exógenos que causan un aumento o disminución en la expresión del gen. Además, el producto del gen puede en sí administrarse a la célula, o su actividad se elimina de la célula, para lograr el mismo resultado. Los moduladores capaces de disminuir la expresión de un gen incluyen los compuestos de interferencia de ARN o antisentido, mientras que los moduladores capaces de la disminución de la actividad de una proteína incluyen fármacos, anticuerpos, aptámeros y similares.

En un aspecto, la diferenciación de la célula se controla mediante la observación del fenotipo de la célula o la detección

de la modulación de la expresión de uno o más genes en una célula, lo que determina, de ese modo, el estado de diferenciación de dicha célula. La determinación del fenotipo puede llevarse a cabo mediante una variedad de técnicas, por ejemplo mediante inspección visual de las unidades celulares bajo un microscopio, o mediante el uso de la selección de gran contenido e instrumentación de análisis (ver Cellomics Inc; www.cellomics.com). Alternativamente la diferenciación puede detectarse mediante la observación de un producto marcador característico de la célula diferenciada. Este puede ser un marcador endógeno, tal como una secuencia particular de ADN o de ARN, o una proteína celular que puede detectarse por un ligando, la conversión de un sustrato enzimático, o un anticuerpo que reconoce un marcador fenotípico particular. Un marcador de diferenciación puede, además, ser exógeno, es decir, uno que se ha introducido en la población de células, por ejemplo mediante transfección o transducción viral. Ejemplo de marcadores exógenos son las proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) antígenos de superficie celular que no se expresan normalmente en un linaje celular particular o que se modifican por epítopos, o de una especie diferente. Un transgén o gen marcador exógeno con elementos de control transcripcional asociados puede expresarse en una manera que refleja un patrón representativo de un(os) gene(s) endógeno(s), indicativo del fenotipo o el estado de diferenciación. Esto puede conseguirse mediante la asociación del gen con un promotor específico del tipo de células, o mediante la integración del transgén en un locus particular (por ejemplo ver patente europea núm. EP 0695351). Los marcadores indicativos de diferenciación pueden detectarse por una variedad de técnicas, tanto manuales como automatizadas, que incluyen la observación bajo un microscopio, purificación por afinidad ('inmunoselección'), o separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Por consiguiente, la presente descripción proporciona un método de controlar la diferenciación en donde la modulación de la expresión de uno o más genes indicadores se observa en donde el gen(es) indicador(es) responde(n) a uno o más estados de diferenciación de dicha célula.

En una modalidad adicional, la expresión de genes implicados se controla en un chip génico. La expresión génica puede convenientemente analizarse mediante el uso de una tecnología de matriz o chip génico, que está ampliamente disponible de suministradores tal como Affymetrix.

Ventajosamente, los genes empleados en este análisis, codifican marcadores extracelulares, que pueden detectarse, por ejemplo, mediante inmunoensayo.

En otra modalidad de la invención la diferenciación de una célula se controla por pérdida de la capacidad proliferativa.

La descripción proporciona además métodos de cultivo de células madre, y células diferenciadas derivadas de células madre *in vitro*, adherentes a microportadores, tal como perlas. El cultivo en microportadores tiene ventajas significativas, que incluyen el escalado de los cultivos, y además permite que las unidades de células madre se expongan a condiciones de cultivo seleccionadas según sea necesario para obtener el crecimiento y/o condiciones de diferenciación deseados.

El modulador potencial puede comprender una pequeña molécula orgánica o inorgánica, un carbohidrato natural o derivatizado, proteína, polipéptido, péptido, glucoproteína, ácido nucleico, ADN, ARN, oligonucleótido o proteína-ácido nucleico (PNA). En otra modalidad el modulador potencial se obtiene a partir de una biblioteca de moléculas pequeñas con propiedades similares al fármaco.

En un aspecto adicional, se proporciona un modulador de una vía de señalización celular obtenido u obtenible por los métodos descritos en la presente descripción.

En otro aspecto se proporciona una composición farmacéutica que comprende el modulador junto con un portador farmacéuticamente aceptable; diluyente o excipiente.

En un aspecto adicional, se proporciona una célula parcialmente diferenciada, que se ha diferenciado *in vitro* a partir de una célula madre y se ha estancado a lo largo de una vía de diferenciación entre una célula madre y un tipo de célula diferenciada. La célula parcialmente diferenciada puede ser una célula neuronal o hematopoyética. La célula parcialmente diferenciada puede ser una célula bipotente. La célula parcialmente diferenciada puede ser una célula unipotente.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para identificar un modulador de una vía de señalización celular (por ejemplo, un fármaco regenerativo) que comprende el uso de una célula progenitora.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para identificar un modulador de una vía de señalización celular (por ejemplo, un fármaco regenerativo) que comprende el uso de una célula parcialmente diferenciada, que se ha diferenciado *in vitro* a partir de una célula madre y se ha estancado a lo largo de una vía de diferenciación entre una célula madre y un tipo de célula diferenciada.

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de una célula progenitora en un ensayo de selección de fármacos para identificar un modulador de una vía de señalización celular (por ejemplo, un fármaco regenerativo).

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de una célula parcialmente diferenciada, que se ha diferenciado *in vitro* a partir de una célula madre, y se ha estancado a lo largo de una vía de diferenciación entre una célula madre y un tipo de célula diferenciada, en un ensayo de selección de fármacos para identificar un modulador de una vía de señalización celular (por ejemplo, un fármaco regenerativo).

En un aspecto adicional, se proporciona un método para diferenciar una célula madre embrionaria en una progenitora del linaje mieloide, que comprende el uso de un microportador de gelatina (por ejemplo, un microportador CultiSpher).

5 En un aspecto adicional, se proporciona el uso de un microportador de gelatina (por ejemplo, un microportador CultiSpher) para la diferenciación de células madre embrionarias en progenitoras hematopoyéticas.

10 En un aspecto adicional, se proporciona un método para producir una célula hematopoyética a partir de una célula madre *in vitro* que comprende exponer dicha célula madre a una o más, preferentemente, dos o más, condiciones de reacción, en donde dichas condiciones de reacción comprenden incubar dichas células madre con: (a) ácido retinoico, dimetilsulfóxido (DMSO) y/o factor de células madre (SCF); y (b) insulina, factores de células madre (SCF), TGF beta 1, BMP2, BMP4 y/o TPO; y (c) IL-3, IL-6, TPO, EPO y/o M-CSF.

15 En una modalidad, la célula madre se siembra sobre un microportador- tal como un microportador de gelatina.

En una modalidad, la célula madre está contenida en un medio basal IMDM o un Medio de Expansión Hematopoyética Stemline.

20 En una modalidad, en la etapa (b) se usa insulina sola.

En una modalidad, en la etapa (b) se usan SCF, TGF beta 1, BMP2 y TPO.

En una modalidad, en la etapa (c) se usan IL-3 e IL-6. En otra modalidad, se usan, además, TPO, EPO y/o M-CSF.

25 En una modalidad, la etapa (a) se realiza en el día 1.

En una modalidad, la etapa (b) se realiza en el día 4.

30 En una modalidad, la etapa (c) se realiza en el día 6.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

35 Condiciones de Cultivo. Como se usa en la presente descripción, el término "condiciones de cultivo" se refiere al ambiente en que se colocan las células o se exponen para promover el crecimiento o diferenciación de dichas células. Así, el término se refiere al medio, temperatura, condiciones atmosféricas, sustrato, condiciones de agitación y similares que pueden afectar el crecimiento y/o la diferenciación de las células. Más particularmente, el término se refiere a agentes específicos que pueden incorporarse en los medios de cultivo y que pueden influir en el crecimiento y/o diferenciación de las células.

40 Célula. Una célula, como se refiere en la presente descripción, se define como la unidad estructural más pequeña de un organismo que es capaz de funcionar independiente, o de un organismo unicelular, que consiste en uno o más núcleos, citoplasma y varios orgánulos, todo rodeado de una membrana celular semipermeable o pared celular. La célula puede ser procariótica, eucariótica o arqueobacteria. Por ejemplo, la célula puede ser una célula eucariótica. Las células de mamíferos son adecuadas, especialmente células humanas. Las células puede ser naturales o modificadas, tal como mediante manipulación genética o pases de cultivo, para conseguir las propiedades deseadas. Una célula madre se define con más detalle más adelante, y es una célula totipotente, pluripotente o multipotente capaz de dar lugar a más de un tipo de célula diferenciada. Las células madre pueden diferenciarse *in vitro* para dar lugar a células diferenciadas, que pueden ser ellas mismas multipotentes, o pueden diferenciarse terminalmente. Las células diferenciadas *in vitro* son células que se han creado artificialmente mediante la exposición de las células madre a uno o más agentes que promueven la diferenciación celular.

55 Primer tipo de célula. En una modalidad, el primer tipo de célula es una célula que conserva la capacidad de renovarse a través de la división celular y puede diferenciarse en una amplia gama de tipos de células especializadas. En otra modalidad, el primer tipo de célula es una célula que es menos diferenciada que una célula progenitora. En otra modalidad, el primer tipo de célula es una célula madre, como se describe en la presente descripción más adelante. La célula madre puede ser, por ejemplo, una célula madre embrionaria o una célula madre adulta. Las células del primer tipo de célula puede diferenciarse en un determinado linaje de un segundo tipo de célula antes de que se criben las células del segundo tipo de células. Así, en una modalidad, el primer tipo de célula se diferencia en un segundo tipo de célula mediante la exposición (por ejemplo, exponer secuencialmente) el primer tipo de célula a dos o más (por ejemplo, tres o más, cuatro o más, o cinco o más) condiciones de reacción.

60 Segundo tipo de célula. En una modalidad, el segundo tipo de célula es la célula que sólo se puede diferenciar, pero no puede renovarse más ella misma. El segundo tipo de célula puede ser más limitado en los tipos de células que pueden llegar a ser, que el primer tipo de célula. El segundo tipo de célula puede ser más diferenciada que el primer tipo de célula. El segundo tipo de célula puede ser más diferenciada que la célula progenitora. En una modalidad, el segundo tipo

de célula es una célula parcialmente diferenciada, que se ha diferenciado *in vitro* a partir de un primer tipo de célula y se ha estancado a lo largo de una vía de diferenciación entre el primer tipo de célula (por ejemplo, una célula madre) y un tipo de célula diferenciada. En otra modalidad, el segundo tipo de célula es una célula con fenotipo de célula objetivo.

5 Medicamento o fármaco regenerativo. El término 'fármaco regenerativo' se refiere a una sustancia natural o sintética que actúa sobre células madre o células progenitoras y así es capaz de regenerar o reparar un tejido u órgano del cuerpo. 'Medicina regenerativa' se refiere a lo mismo, o a la disciplina de la regeneración de tejidos u órganos como un tratamiento médico. La medicina regenerativa abarca las terapias de reemplazo celular y/o la administración de fármacos regenerativos a los pacientes.

10 Progenitora. Una progenitora o 'célula progenitora' es un tipo de célula que se encuentra corriente arriba de una célula más diferenciada, pero corriente abajo de una célula madre verdadera. Los progenitores, típicamente, no son capaces de la autorrenovación a largo plazo ya que son verdaderas células madre, y su potencial de desarrollo es más limitado de lo que es el de las células madre. Por ejemplo CFU-E y BFU-E son poblaciones de células progenitoras comprometidas con eritrocitos, mientras que la LT-HSC es una célula madre hematopoyética multipotentes de autorrenovación y la célula ES una célula madre pluripotente y de autorrenovación. Los eritrocitos diferenciados pueden derivarse de CFU-E que a su vez puede derivarse de LT-HSC que a su vez puede derivarse de células ES.

20 Señalización celular. El término "señalización celular" se refiere a los mecanismos moleculares, por los cuales las células detectan y responden a estímulos externos y envían mensajes a otras células. La señalización celular, por tanto, incluye controles y mecanismos transcripcionales y traduccionales, así como también mecanismos de transducción de señales.

25 Modulador. El término "modulador" se refiere a cualquier factor que puede variar el estado de una célula, mediante el cambio de esta de un estado a otro. En el contexto de la invención esto se refiere a la modulación de los procesos de señalización celular. Los moduladores pueden inhibir o promover vías de señalización celular particulares. Pueden adoptar la forma de productos naturales o moléculas de síntesis química; por ejemplo, una pequeña molécula orgánica o inorgánica, un carbohidrato natural o derivatizado, proteína, polipéptido, péptido, glicoproteína, ácido nucleico, ADN, ARN, oligonucleótido o proteína-ácido nucleico (PNA). Los moduladores incluyen, además, agonistas o antagonistas. Los moduladores que son inhibidores incluyen pero sin limitarse a: inhibidores no específicos, irreversibles, reversibles - competitivos y no competitivos. Los moduladores que promueven la señalización celular estimulan o potencian el efecto de una vía molecular particular sobre la célula e incluyen, pero sin limitarse a: agonistas, miméticos agonistas, cofactores, promotores y similares.

35 Amplificación. La "amplificación" se refiere a un proceso por el cual se produce un aumento de la magnitud o el número de células, componentes celulares o procesos celulares. En particular la amplificación se refiere a un proceso de aumentar el número de células en un sistema de cultivo de células. Esto puede ocurrir mediante el aumento de la tasa de proliferación o supervivencia de las células en el sistema.

40 Compuesto. El término "compuesto" se usa en la presente descripción de acuerdo con el significado normalmente asignado al mismo en la técnica. El término compuesto se usa en su sentido más amplio, es decir, una sustancia que comprende dos o más elementos en proporciones fijas, que incluyen moléculas y complejos supramoleculares. Esta definición incluye moléculas pequeñas (típicamente <500 daltons) que componen la mayoría de los productos farmacéuticos. Sin embargo, la definición incluye, además, moléculas más grandes, que incluyen polímeros, por ejemplo polipéptidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, y complejos supramoleculares.

45 Selección de alto rendimiento. El término "selección de alto rendimiento" se refiere a la evaluación de prueba y error a gran escala de compuestos en un ensayo paralelo basado en un objetivo o basado en células.

50 Biblioteca de compuestos. Una "biblioteca de compuestos" es un grupo de diversos compuestos que pueden usarse para identificar nuevos candidatos principales en el proceso de descubrimiento de fármacos. Las bibliotecas de compuestos pueden generarse por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye la química combinatoria, evolución del compuesto, o adquirirse de fuentes comerciales tales como Sigma Aldrich, Discovery Partners International, Maybridge y Tripos. Un repertorio comprende, ventajosamente, al menos 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o más de compuestos diferentes, que pueden estar relacionados o no relacionados en estructura o función.

55 Modulación. El término modulación se usa para significar un aumento y/o disminución en el parámetro que se modula. Así, la modulación de la expresión génica incluye tanto el aumento de expresión génica como la disminución de la expresión génica.

60 Proceso celular. Un proceso celular es cualquier característica, función, proceso, evento, causa o efecto, intracelular o extracelular, que se produce o se observa o que puede atribuirse a una célula. Ejemplos de procesos celulares incluyen, pero sin limitarse a, viabilidad, senescencia, muerte, pluripotencia, morfología, señalización, unión, reconocimiento, producción o destrucción (degradación) de moléculas, mutación, plegamiento de proteínas, transcripción, traducción, catálisis, transmisión sináptica, transporte vesicular, función de orgánulos, ciclo celular, metabolismo, proliferación, división, diferenciación, fenotipo, genotipo, expresión génica, o el control de estos procesos.

Unidad celular. Un grupo de células, que puede ser un grupo de una. Las agrupaciones de unidades celulares pueden clasificarse, subdividirse y manipularse sin disociar, sustancialmente, las unidades celulares mismas, tal que la unidad celular se comporta como una colonia de células y cada célula en la unidad celular se expone a las mismas condiciones de cultivo. Por ejemplo, una unidad celular puede comprender una perla a la que se adhiere un grupo de células.

Totipotente. Una célula totipotente es una célula con el potencial de diferenciarse en cualquier tipo de célula somática o germinal que se encuentra en el organismo. Así, cualquier célula deseada puede derivarse, por algunos medios, a partir de una célula totipotente.

Pluripotente o Multipotente. Una célula pluripotente o multipotente es una célula que puede diferenciarse en más de uno, pero probablemente no en todos, los tipos de células.

Marca. Una marca o etiqueta, como se usa en la presente descripción, es un medio para identificar una unidad celular y/o para determinar una condición de cultivo, o una secuencia de condiciones de cultivo, a las cuales la unidad celular se ha expuesto. Así, una marca puede ser un grupo de marcas, cada una que se añade en una etapa de cultivo específica; o una marca que se añade al principio o el experimento que se modifica de acuerdo a, o se rastrea durante, las etapas de cultivo a las que se expone la unidad celular; o simplemente es una referencia posicional, que reconoce las etapas de cultivo que se suelen deducir. Una marca o etiqueta puede ser, además, un dispositivo que informa o registra la ubicación o identidad de una unidad celular en un momento dado, o asigna un identificador único a la unidad celular. Ejemplos de marcas o etiquetas son moléculas de secuencia, estructura o masa únicas; o moléculas fluorescentes u objetos tales como perlas; o radiofrecuencia y otros transpondedores; u objetos con señales o colores o formas únicos.

Exposición a condiciones de cultivo. Una célula se expone a condiciones de cultivo cuando se pone en contacto con un medio, o se cultiva en condiciones que afectan uno o más procesos celulares, tales como el crecimiento, diferenciación o estado metabólico de la célula. Así, si las condiciones de cultivo comprenden cultivar la célula en un medio, la célula se pone en el medio durante un período de tiempo suficiente para que tenga un efecto. Igualmente, si las condiciones son condiciones de temperatura, las células se cultivan a la temperatura deseada.

Combinación. La combinación de uno o más grupos de unidades celulares implica la mezcla de los grupos para crear un solo grupo o colección que comprende unidades celulares de más de una basal, es decir, que se ha expuesto a más de uno de los diferentes conjuntos de condiciones de cultivo. Una agrupación puede subdividirse, además, en grupos ya sea al azar o no al azar; tales grupos no son en sí mismos "agrupaciones" para los propósitos actuales, pero pueden por sí mismos agruparse mediante combinación, por ejemplo, después de la exposición a diferentes conjuntos de condiciones de cultivo.

Proliferación. El crecimiento celular y la proliferación celular se usan indistintamente en la presente descripción para denotar la multiplicación del número de células sin diferenciación en diferentes tipos de células o linajes. En otras palabras, los términos denotan aumento de número de células viables. En una modalidad, la proliferación no se acompaña de apreciables cambios en el fenotipo o genotipo.

Diferenciación. La diferenciación celular es el desarrollo, a partir de un tipo de célula, en un tipo diferente de célula. Por ejemplo, una célula bipotente, pluripotente o totipotente puede diferenciarse en una célula neural. La diferenciación puede acompañarse por la proliferación, o puede ser independiente de esta. El término 'diferenciación' se refiere generalmente a la adquisición de un fenotipo de un tipo de célula madura a partir de un tipo de célula menos desarrolladamente definida, por ejemplo, una neurona, o un linfocito, pero no excluye la transdiferenciación, mediante la cual un tipo de célula madura puede convertirse en otro tipo de célula madura, por ejemplo, una neurona en un linfocito. En esta solicitud 'diferenciación' se considerará que significa 'desdiferenciación' y viceversa. Comúnmente, 'desdiferenciación' se refiere a la adquisición de un fenotipo de un tipo de célula menos madura a partir de un tipo de célula más desarrolladamente definida, por ejemplo, un miocito que se convierte en un precursor miogénico. La desdiferenciación puede ir seguida de una diferenciación adicional para revertir al tipo de célula original, o a un tipo de célula posterior [Ding & Shultz (2004) Nature Biotechnology 22: 833-840, y las referencias en esta].

Estado de diferenciación. El estado de diferenciación de una célula es el nivel al cual una célula se ha diferenciado a lo largo de una vía o linaje particular.

Estado de un proceso celular. El estado de un proceso celular se refiere a si un proceso celular se produce o no, y en procesos celulares complejos, puede denotar una etapa o fase particular en ese proceso celular. Por ejemplo, una vía de diferenciación celular en una célula puede estar inactiva o puede haberse inducido y puede comprender un número de etapas o componentes discretos, tales como eventos de señalización caracterizados por la presencia de un conjunto característico de enzimas o productos intermedios.

Gen. Un gen es un ácido nucleico que codifica un producto génico, sea un polipéptido o un producto génico de ARN. Como se usa en la presente descripción, un gen incluye al menos la secuencia codificante que codifica, el producto génico; puede, opcionalmente, incluir una o más regiones reguladoras necesarias para la transcripción y/o traducción de la secuencia codificante.

Producto génico. Un producto génico es, típicamente, una proteína codificada por un gen en la manera convencional. Sin embargo, el término abarca, además, productos génicos no polipeptídicos, tales como ácidos ribonucleicos, que están codificados por el gen.

Síntesis de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse de acuerdo con cualquier técnica disponible. En una modalidad, la síntesis de ácidos nucleicos está automatizada. Además, los ácidos nucleicos pueden producirse mediante replicación biológica, tal como mediante clonación y replicación en células bacterianas o eucariotas, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

Expresión diferencial. Genes que se expresan a diferentes niveles en respuesta a condiciones de cultivo celular, pueden identificarse por el análisis de la expresión génica, tal como en una matriz de genes, por métodos conocidos en la técnica. Los genes que se expresan diferencialmente muestran una mayor o menor cantidad de ARNm o de producto génico en la célula bajo las condiciones de ensayo que bajo condiciones alternativas, relacionadas con los niveles globales de expresión génica.

Transfección. Los genes pueden transfectarse en células por cualquiera de los medios apropiados. El término se usa en la presente descripción para significar la transfección convencional, por ejemplo, mediante el uso de fosfato de calcio, pero además, para incluir otras técnicas para la transferencia de ácidos nucleicos en una célula, que incluyen la transformación, transducción viral, electroporación y similares.

Ensayos basados en células

Los ensayos basados en células son una parte importante de las ciencias biomédicas modernas y comprenden cualquier ensayo que implica una etapa en la que se usa una célula. Los ensayos basados en células pueden usarse en casi todas las fases del proceso de descubrimiento y desarrollo de medicamentos farmacéuticos, y son valiosos para proporcionar información acerca de cómo un compuesto es probable que interactúe en un sistema biológico, no sólo acerca de cómo interactúa con un objetivo de fármaco potencial en el aislamiento.

Por ejemplo, los ensayos basados en células pueden usarse para identificar y validar objetivos de fármacos potenciales. Los ensayos basados en células que se han desarrollado pueden usarse para identificar genes o vías celulares implicadas en procesos de enfermedades, para determinar las funciones de los genes objetivo o para medir los cambios fenotípicos que pueden inducirse después de la activación de ciertos genes o su productos.

Los ensayos basados en células pueden usarse, además, en el descubrimiento de fármacos para el descubrimiento, selección y optimización de compuestos líderes. A diferencia de los ensayos bioquímicos que se usan a menudo en los ensayos de cribado de alto rendimiento tradicionales, los ensayos basados en células pueden proporcionar información relativa a las propiedades del fármaco tales como absorción, permeabilidad, selectividad, especificidad y metabolismo. Como resultado, los compuestos líderes que se seleccionan después de la selección basada en células están mejor caracterizados, más probable que proporcionen valiosos líderes, y menos probable que sean eliminados en las fases posteriores del proceso de descubrimiento de fármacos.

Una aplicación importante de los ensayos basados en células es la selección de toxicidad. Una parte crucial del descubrimiento de fármacos es la selección de los candidatos de fármacos para eliminar compuestos que causarán efectos secundarios. Sin embargo, las metodologías actuales, son muy inadecuadas, y particularmente el uso de modelos animales para la selección de toxicidad es caro y prolongado. Además, los modelos animales pueden ser poco fiables, porque los resultados en estos modelos no siempre predicen con precisión cómo un compuesto se desempeñará en humanos. Así la selección basada en células humanas es adecuada.

Ensayos de Selección y HTS

Los cribados de alto rendimiento (HTS) pueden usarse en la presente invención para el cribado de nuevos objetivos de fármacos. El énfasis de las actividades de investigación farmacéutica se ha desplazado hacia el descubrimiento intencional de nuevas clases químicas y nuevos objetivos moleculares. Este cambio de énfasis, y los progresos tecnológicos oportunos (por ejemplo, la biología molecular, la automatización del laboratorio, la química combinatoria) dieron nacimiento a la selección de alto rendimiento, o HTS, que ahora está muy extendida en toda la industria biofarmacéutica.

La selección de alto rendimiento implica varias etapas: crear un ensayo que es predicativo de una respuesta fisiológica particular; automatizar el ensayo de manera que sea reproduciblemente ejecutado un gran número de veces; y, probar secuencialmente las muestras a partir de una biblioteca química para identificar estructuras químicas capaces del "acierto" del ensayo, lo que sugiere que tales estructuras pudieran ser capaces de provocar la respuesta fisiológica deseada. Los aciertos del cribado de alto rendimiento se investigan en una variedad de ensayos secundarios para eliminar los resultados ficticios, particularmente compuestos tóxicos. Así, los ensayos usados en los cribados de alto rendimiento se destinan a detectar la presencia de muestras químicas (por ejemplo, compuestos, sustancias, moléculas) que poseen propiedades bioquímicas y biológicas específicas. Estas propiedades se eligen para identificar compuestos con el potencial de provocar

una respuesta biológica específica cuando se aplican in vivo. Los cribados de alto rendimiento identifican tanto agentes que pueden usarse como fármacos ellos mismos y, además, los fármacos candidatos que finalmente se usarán como fármacos. Un compuesto de una cierta clase de producto químico se encuentra que tiene un cierto nivel de propiedad biológica deseada en un ensayo de alto rendimiento, puede, después, ser la base para la síntesis de compuestos derivados. Los ensayos basados en células utilizan células intactas en cultivo. Ejemplos de tales ensayos incluyen ensayos de gen indicador de luciferasa y ensayos de flujo de calcio.

Un método particularmente potente de realizar un ensayo basado en células adecuado para la identificación de moduladores de la diferenciación y fármacos regenerativos, como se describe en la presente invención, es para determinar el estado de diferenciación de células progenitoras mediante el control de un marcador genético de la diferenciación. El marcador puede ser endógeno, tal como una secuencia de nucleótidos expresada o proteína que está presente específicamente en el tipo de célula diferenciada pero no en su progenitora, ni en ninguna otra célula presente en la población de células usadas para la selección. El marcador puede, además, ser un marcador exógeno (es decir, un gen indicador) que se introduce en la población de células usada para la selección, de tal manera que, se expresa específicamente en el tipo de célula diferenciada, pero no en su progenitora, ni en ninguna otra célula presente en la población de células usadas para la selección. Ejemplos de marcadores exógenos son las enzimas tal como Lac Z, o marcadores no enzimáticos tal como proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP; YFP, etc.) o antígenos de superficie celular que no se expresan normalmente en un linaje celular particular o que están modificados por epítomos, o de una especie diferente. Un transgén o gen marcador exógeno con elementos de control transcripcional asociados puede expresarse en una manera que refleja un patrón representativo de un(os) gene(s) endógeno(s). Esto puede conseguirse mediante la asociación del gen con elementos de un promotor específico del tipo de célula, o mediante la integración del transgén en un locus particular que se expresa en una manera específica del tipo de célula (por ejemplo ver patente europea núm. EP 0695351).

En una modalidad, el tipo de célula indiferenciada usado como material de partida se modifica para expresar dos marcadores/indicadores (por ejemplo, tanto GFP como YFP) de tal manera que un marcador indica la presencia del tipo de células progenitora presentado en el proceso HTS, y el otro marcador indica la presencia del tipo de célula diferenciada producido por la adición de un modulador adecuado.

Un número de sistemas de genes indicadores y ensayos de selección celulares adecuados, que incluyen sistemas indicadores duales reportero, se describen en las revisiones (y las referencias en estas) por Hill y otros. [Current Opinion in Pharmacology (2001) 1:526-532] y por Blake [Current Opinion in Pharmacology (2001) 1:533-539].

Célula progenitora

Una célula progenitora es cualquier célula somática que tiene la capacidad de generar progenie completamente diferenciada, funcional mediante diferenciación y proliferación. Las células progenitoras incluyen células progenitoras a partir de cualquier tejido u órgano del sistema, que incluyen, pero sin limitarse a, sangre, nervios, músculos, piel, intestino, hueso, riñón, hígado, páncreas, timo, y similares.

Las células progenitoras pueden distinguirse de las células diferenciadas (*es decir* aquellas células que pueden o no tener la capacidad para proliferar, *es decir*, se autorreplican, pero que son incapaces de experimentar una diferenciación adicional en un tipo de célula diferente bajo condiciones fisiológicas normales). Las células progenitoras pueden distinguirse, además, de las células anormales - tales como las células cancerosas, especialmente células de leucemia, que proliferan (se autorreplican) pero que generalmente no se diferencian más, a pesar de parecer estar inmaduras o indiferenciadas.

Las células progenitoras incluyen todas las células en un linaje de diferenciación y proliferación anteriores a la célula más diferenciada o completamente madura.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención se infiere una distinción entre una 'célula madre' y una célula 'progenitora'. Las células madre son típicamente pluripotentes y multipotentes y pueden dar lugar a un número de linajes. Las células progenitoras, particularmente las células progenitoras comprometidas en un linaje, sólo son capaces de producir las células de un único linaje. Por tanto el potencial de desarrollo de células progenitoras es, típicamente, más restringido que el de las células madre. Una segunda diferencia importante entre las células madre y células progenitoras es que las células madre son capaces de la amplificación significativa - bajo condiciones de cultivo correctas pueden dividirse indefinidamente - mientras que las células progenitoras tienen una capacidad de proliferación limitada. Estas diferencias significan que, por ejemplo, Es posible reconstituir el sistema hematopoyético de un animal mediante el uso de células madre hematopoyéticas, pero no con las células progenitoras hematopoyéticas.

A modo de ejemplo, la producción de, células rojas de la sangre maduras, funcionales resultan de la proliferación y diferenciación de "progenitoras unipotenciales", *es decir*, aquellas progenitoras que tienen la capacidad de hacer sólo un tipo de un tipo de célula sanguínea. Varias otras progenitoras hematopoyéticas (HPC) se han caracterizado.

Las HPC consisten en muchas subclases que incluyen las células madre pluripotentes, las células madre linfoides, los granulocitos de unidades formadoras de colonias CFU-GEMM, eritroides, macrófagos o megacariocitos, granulocitos o

macrófagos de unidades formadoras de colonias BFU-E, CFU-E, CFU-Meg, CFU-GM, eósinófilos de unidades formadoras de colonias CFU-EoS, las células B progenitoras y células T progenitoras.

Células Madre

Las células madre se describen en detalle en *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. US Department of Health and Human Services. junio 2001. <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>.

Las células madre son células que son capaces de diferenciarse para formar al menos una y, a veces, muchos tipos de células especializadas. El repertorio de las diferentes células que pueden formarse a partir de células madre se cree que es exhaustivo; es decir, este incluye todos los diferentes tipos de células que componen el organismo. Las células madre están presentes en toda la vida de un organismo, desde el embrión temprano donde son relativamente abundantes, hasta el adulto donde son relativamente raras. Las células madre presentes en muchos tejidos de animales adultos son importantes en la reparación normal de tejidos y la homeostasis.

La existencia de estas células ha planteado la posibilidad de que podrían proporcionar un medio de generación de células funcionales especializadas *in vitro* que pueden trasplantarse en humanos y reemplazar las células muertas o que no funcionan en tejidos enfermos. La lista de enfermedades para las que esto puede proporcionar terapias incluye la enfermedad de Parkinson, la diabetes, lesión de la médula espinal, derrame cerebral, enfermedad cardíaca crónica, enfermedad renal de fase terminal, fallo del hígado y cáncer. Para que la terapia de reemplazo celular sea viable, se requiere un número progresos importantes en la investigación de células madre, que incluyen mejoras en el crecimiento de las células madre, la diferenciación de las células madre y la anulación del rechazo inmunológico de las células madre.

Por esta razón, se consideran enfoques alternativos para explotar las células madre para terapias. Como se describe en la presente descripción, se describen métodos para el descubrimiento de compuestos que pueden desarrollarse en fármacos, (por ejemplo fármacos regenerativos) causantes que las células madre endógenas regeneren los tejidos del cuerpo.

Tipos de células madre

Aún existe debate considerable sobre lo que constituye una célula madre, sin embargo, para los propósitos de esta discusión una característica clave es la capacidad de diferenciarse en un tipo de célula diferente. Una característica opcional es la capacidad de autorregeneración, en ciertos casos indefinidamente, lo que permite la amplificación de los números de células. Ejemplos de células madre se dan más adelante.

Diferentes células madre tienen potencial diferente para formar varios tipos de células: las células madre espermatogoniales son unipotentes, ya que producen naturalmente únicamente espermatozoos, mientras que las células madre hematopoyéticas son multipotentes y las células madre embrionarias se cree que son capaces de dar lugar a todos los tipos de células y se dice que son totipotentes o pluripotentes.

Hasta la fecha, se han aislado tres tipos de células madre pluripotentes de mamíferos. Estas células pueden dar lugar a tipos de células que normalmente se derivan de las tres capas germinales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo). Los tres tipos de células madre son: células embrionarias de carcinoma (EC), derivadas de tumores de testículos; células madre embrionarias (ES), -derivadas de la preimplantación del embrión (normalmente el blastocito); y células germinales embrionarias (EG) derivadas de la implantación posterior del embrión (normalmente las células del feto destinadas a convertirse en parte de las gónadas). Estas células están recibiendo atención particular en el esfuerzo por dirigir la diferenciación, precisamente porque son pluripotentes:

Las células madre están presentes también en el organismo adulto. Una célula madre adulta es una célula indiferenciada que surge en un tejido diferenciado (especializado), se renueva por sí misma, y puede diferenciarse para producir células más especializadas. Recientemente se ha demostrado que las células madre adultas son capaces de plasticidad, es decir, que pueden diferenciarse para producir tipos de células que no son característicos del tejido en el que residen, ni tampoco de la capa germinal de la cual ese tejido se origina. Por ejemplo, se ha demostrado que las células madre de la sangre (derivadas del mesodermo) pueden diferenciarse en neuronas, (normalmente derivadas del ectodermo. Toma y otros. (2001, *Nature Cell Biol.* 3, págs. 778-784) han descrito recientemente la identificación y el aislamiento de un tipo de célula madre que se derivó de la dermis de la piel. Estas células madre se denominaron células precursoras derivadas de la piel (SKP). Las células SKP podrían inducirse a diferenciarse mediante cultivo en polilisina y variación de la concentración de suero en el medio de cultivo. En ausencia de suero ellas se diferencian en neuronas y células gliales; con adición de 3 % de suero se diferencian en células de la musculatura lisa; y con aumento del suero en 10 % causa que las células SKP se diferencien en adipocitos. Las células madre adultas se han descrito hasta ahora en tejidos tan diversos como el sistema nervioso, la médula ósea y la sangre, el hígado, músculo esquelético, la piel y el sistema digestivo.

Adicionalmente a las células madre adultas existen numerosos tipos de células progenitoras o precursoras, como se describe en la presente descripción. Estas son células que están parcialmente restringidas en su diferenciación potencial y surgen probablemente en todos los tejidos del cuerpo - ellas son capaces de diferenciarse, pero difieren de las células madre en que su repertorio no es tan amplio, y por definición, no son capaces de autorrenovación.

La evidencia reciente sugiere que incluso los tipos de células diferenciadas son capaces de cambiar el fenotipo. Este fenómeno, denominado transdiferenciación, es la conversión de un tipo de célula diferenciada en otro, con o sin una división celular intermedia. Previamente, se aceptó generalmente que el estado diferenciado terminal es fijo, pero ahora está claro que la diferenciación puede, a veces, revertirse o alterarse. Los protocolos in vitro están disponibles ahora en los que las líneas de células pueden inducirse a transdiferenciarse (ver Shen, Slack & Tosh, 2000, *Nature Cell Biol.* vol 2, págs. 879-887; Horb y otros, 2003, *Current Biol.* Vol 13, págs. 105-115). Finalmente, ha habido informes de tipos de células especializadas que pueden desdiferenciarse para producir células como las madre con el potencial de diferenciarse en tipos adicionales de células.

Crecimiento de células madre y diferenciación

Una propiedad importante de las células madre es su capacidad de dividirse simétricamente en cultivo, lo que da lugar a dos células hijas que son copias exactas de la célula madre de la que se derivaron. Esto permite que las células madre se expandan en cultivo en su estado indiferenciado, lo que produce suficiente material para propósitos de selección, estudios biológicos o incluso de terapia celular. Los medios por los que las células madre son capaces de hacer esto es comprensiblemente el objeto de intensas investigaciones, todavía no muchos de los factores que promueven la renovación de las células madre se conocen. Típicamente, las líneas de células madre pluripotentes se mantienen en capas alimentadoras mitóticamente inactivas de fibroblastos, o se condicionan en el medio por tales células. Se supone que las células alimentadoras eliminan/neutralizan algún factor desconocido del medio de cultivo, y/o ellas proporcionan un factor que suprime la diferenciación y promueve la autorrenovación de las células madre. Uno de tales factores es el factor inhibidor de leucemia (LIF), un miembro de la familia de las citoquinas relacionado con IL-6, que es capaz de promover la autorrenovación de células ES de ratón en ausencia de las células alimentadoras. Las células madre cultivadas en ausencia de las células alimentadoras (y/o LIF) a menudo se diferencian espontáneamente y fortuitamente, lo que produce una mezcla de tipos de células diferenciadas. Más recientemente, se produjeron líneas de células ES capaces de crecer en cultivo libre de alimentadoras y bajo condiciones definidas.

Los factores que influyen en la autorrenovación de las células madre pueden ser lo mismo estimulantes que inhibidores y pueden funcionar extracelular o intracelularmente. En el caso del factor secretado LIF, se sabe que su receptor extracelular es gp 130, y que la activación de esta proteína es suficiente para inhibir la diferenciación de células ES de murino. Dentro de la célula, un efector corriente abajo crucial de gp130 es el transductor de señal de la transcripción-3 (STAT-3). Otra molécula que es particularmente importante en el mantenimiento de la pluripotencia de células madre es el factor de transcripción Oct-4, que cuando se regula por defecto artificialmente, conduce a la pérdida del estado pluripotente en células ES de ratones. Otras moléculas de señalización que inhiben naturalmente la autorrenovación de células ES, tales como las proteínas quinasas activadas por mitógeno, también se han dilucidado. Una meta importante de la investigación de células madre será el descubrimiento de factores naturales y sintéticos, fármacos, polipéptidos, genes, oligonucleótidos, medios y condiciones de cultivo de tejidos, medios condicionados específicos, células alimentadoras y otros estímulos que tienen el efecto de promover la expansión y la retención del potencial de diferenciación de varios tipos de células madre. Esto incluye células madre adultas, que en la actualidad no se han expandido apreciablemente en cultivo celular.

El segundo gran reto de la investigación de células madre es dirigir la diferenciación de las células madre a tipos particulares de células que son funcionales, poder reemplazar células perdidas en diversos estados de enfermedad, y redundar en un resultado clínico positivo. Inducir a las células madre para comenzar la diferenciación es en realidad un proceso bastante sencillo. Por ejemplo, las células ES extraídas de los cultivos de alimentadoras y cultivadas hasta la convergencia sobre un sustrato adherente comenzarán a diferenciarse espontáneamente. Similarmente, las células ES extraídas de cultivos de alimentadoras y cultivadas sobre un sustrato no adherente, formarán cuerpos embrioides-agrupaciones de células indiferenciadas y parcialmente diferenciadas de las tres capas germinales. Estas células pueden disociarse posteriormente y sembrarse en cultivo en monocapa, y exponerse a los factores que promueven la diferenciación. Los cultivos expuestos a estos factores son más propensos a poblarse por menos tipos de células diferenciadas, en comparación con los cuerpos embrioides o cultivos no tratados de células en diferenciación, que comprenden mezclas de muchos tipos de células diferentes. No obstante, pocas o ninguna de las condiciones se han diseñado hasta ahora que produzcan sustancialmente cultivos puros de células diferenciadas. Adicionalmente, no está claro si cualquiera de los protocolos diseñados para la diferenciación de las células madre, producen células que son adecuadas para la terapia de reemplazo celular - puede ser que las células no se hayan diferenciado terminalmente en el fenotipo preciso requerido, o que las células diferenciadas ya no son viables in vivo.

Los factores que se han usado para inducir la diferenciación dirigida de las células madre incluyen, ácido retinoico, factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteínas morfogénicas óseas (BMPs), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), activina-A, factor beta-1 de crecimiento transformante (TFG β -1), factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento nervioso, homólogo del erizo sónico (SHH), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, vitamina D3, dexametasona, β -mercaptoetanol, hidroxianisol butilado, 5-azacitidina, DMSO, insulina, hormona tiroidea (T3), LIF, suero fetal de ternero, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor Steel, variaciones en la concentración de oxígeno, ácido ascórbico, β -glicerofosfato, nicotinamida, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), cAMP, varias moléculas de adhesión celular y sustratos, y otros. Adicionalmente a estos factores definidos, es probable que extractos no definidos, tales como

medio condicionado, homogenizados de tejidos humanos y animales, o extractos de plantas pueden usarse para dirigir la diferenciación de células madre. El fraccionamiento progresivo de estos extractos no definidos puede producir fracciones activas o incluso componentes puros con alta potencia. Estos factores pueden añadirse al medio de crecimiento usado en un experimento particular, ya sean solos, o en combinación, o en un orden definido que es crucial para el resultado experimental.

Muchos sistemas que han sido concebidos para la diferenciación de células madre in vitro, son procedimientos complejos de múltiples etapas, en los que la naturaleza precisa de las diversas etapas, así como también, la cronología de las diversas etapas, son importantes. Por ejemplo, Lee y otros (2000, Nature Biotechnology, vol. 18, págs. 675-679) usaron un protocolo de cinco fases para derivar neuronas dopaminérgicas a partir de células ES de ratón: 1) células ES indiferenciadas se expandieron en la superficie del cultivo de tejidos recubierto con gelatina en la presencia de LIF; 2) cuerpos embrioides se generaron en cultivos en suspensión durante 4 días en medio de células ES; 3) las células positivas para nestina se seleccionaron de los cuerpos embrioides en medio ITSFn durante 8 días después de la siembra en la superficie del cultivo de tejidos; 4) las células positivas para nestina se expandieron durante 6 días en medio N2 que contiene bFGF/laminina; 5) finalmente las células precursoras neuronales expandidas se indujeron para diferenciarse mediante la retirada de bFGF del medio N2 que contiene laminina.

En un segundo ejemplo de cultivo de células en serie, Bonner-Weir y otros. [Proc. Natl. Acad. Sci. (2000) 97: 7999-8004] derivaron células productoras de insulina a partir de células ductales pancreáticas humanas: 1) seleccionar células ductales más que células de los islotes por adhesión selectiva sobre una superficie sólida en presencia de suero durante 2-4 días; 2) posteriormente retirar suero y añadir factor de crecimiento de queratinocitos para seleccionar células epiteliales ductales más que fibroblastos durante 5-10 días; y 3) superponer las células con la preparación de matriz extracelular 'Matrigel' durante 3-6 semanas.

En un ejemplo adicional de cultivo de células en serie, Lumelsky y otros. [Science (2001) 292: 1389-1394] derivaron células secretoras de insulina mediante diferenciación dirigida de células madre embrionarias (ES) de ratón: 1) expandir las células ES en presencia de LIF durante 2-3 días 2) generar cuerpos embrioides en ausencia de LIF durante 4 días; 3) seleccionar células positivas para nestina con el uso de medio ITSFn durante 6-7 días; 4) expandir precursores endocrinos pancreáticos en medio N2 que contiene medio B27 complementado y bFGF durante 6 días; y 5) inducir diferenciación en células secretoras de insulina al retirar bFGF y añadir nicotinamida.

Sin embargo, no es sólo la secuencia y duración de las diversas etapas o las series de adición de diferentes factores, lo que es importante en la determinación de la diferenciación celular. Ya que el desarrollo embrionario se regula por la acción de gradientes de factores de señalización que imparten información posicional, es de esperar que la concentración de un solo factor de señalización, y además las concentraciones relativas de dos o más factores, serán importantes en la especificación del destino de una población celular in vitro e in vivo. Las concentraciones de factores varían durante el desarrollo y las células madre responden de manera diferente a diferentes concentraciones de la misma molécula. Por ejemplo, las células madre aisladas del SNC de embriones en fase tardía responden de manera diferente a diferentes concentraciones de EGF: bajas concentraciones de EGF resultan en una señal para proliferar, mientras que concentraciones superiores de EGF resultan en la proliferación y diferenciación en astrocitos.

Muchos de los factores que se han encontrado que influyen la autorrenovación y diferenciación de células madre in vitro son moléculas de origen natural. Esto es de esperar, ya que la diferenciación se induce y se controla por moléculas de señalización y receptores que actúan a lo largo de vías de transducción de señales. Sin embargo, por la misma regla de tres, es probable que muchos compuestos sintéticos tendrán un efecto sobre la diferenciación de células madre. Tales compuestos sintéticos que tienen alta probabilidad de interactuar con objetivos celulares dentro de vías de señalización y transducción de señales, (llamados objetivos con potencial terapéutico) se sintetizan rutinariamente, por ejemplo para la selección de fármacos por compañías farmacéuticas. Una vez conocidos, estos compuestos pueden usarse para dirigir la diferenciación de células madre ex vivo, o pueden administrarse in vivo, en cuyo caso ellos podrían actuar sobre células madre residentes en el órgano objetivo de un paciente.

Variables comunes en el cultivo de tejidos

En condiciones en desarrollo para el cultivo con éxito de un tipo de célula particular, o para conseguir o modular un proceso celular, a menudo es importante considerar una variedad de factores.

Un factor importante es la decisión de si propagar las células en suspensión o como una monocapa unida a un sustrato. La mayoría de las células prefieren adherirse a un sustrato, aunque algunas, que incluyen células transformadas, células hematopoyéticas y células de ascitis, pueden propagarse en suspensión.

Si se asume que el cultivo sea de células adherentes, un factor importante es la elección del sustrato de adhesión. La mayoría de los laboratorios usan plásticos desechables como sustratos para el cultivo de tejidos. Los plásticos que se han usado incluyen poliestireno (el tipo más común), polietileno, policarbonato, plexiglás, PVC, teflón, celofán y acetato de celulosa. Es probable que cualquier plástico puede usarse, pero muchos de estos necesitarán ser tratados para hacerlos humectables y adecuados para la unión celular. Además, es muy probable que cualquier sustrato sólido preparado adecuadamente puede usarse para proporcionar un soporte para las células, y los sustratos que se han usado hasta la

fecha incluyen vidrio (por ejemplo alumbre borosilicato y vidrios de sosa-cal), caucho, fibras sintéticas, dextranos polimerizados, metal (por ejemplo acero inoxidable y titanio) y otros.

- 5 Algunos tipos celulares, tales como epitelio bronquial, endotelio vascular, músculo esquelético y neuronas requieren que el sustrato de crecimiento esté revestido con productos biológicos, usualmente materiales de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno, laminina, polilisina u otros. El sustrato de crecimiento y el método de aplicación (húmedo o revestimiento en seco o gelificación) pueden tener efecto en los procesos celulares, tales como las características de crecimiento y diferenciación de las células, y éstos deben determinarse empíricamente como se discutió anteriormente.
- 10 Probablemente la más evidentemente importante de las variables en el cultivo celular es la elección del medio de cultivo y los suplementos, tal como el suero. Estos proporcionan un compartimiento acuoso para el crecimiento celular, completo con nutrientes y varios factores, algunos de los cuales se han mencionados anteriormente, otros de los que están deficientemente definidos. Algunos de estos factores son esenciales para la adhesión, otros para transmitir información (por ejemplo, hormonas, mitógenos, citocinas) y otros como destoxificantes. Los medios comúnmente usados incluyen
- 15 RPMI 1640, MEM/sales de Hank, MEM/sales de Earle, F12, DMEM/F12, L15, MCDB 153, y otros. Los diversos medios pueden diferir ampliamente en sus constituyentes - algunas de las diferencias comunes incluyen la concentración de bicarbonato de sodio, la concentración de iones divalentes tales como Ca y Mg, la composición del tampón, antibióticos, oligoelementos, nucleósidos, polipéptidos, compuestos sintéticos, fármacos, etc. Se conoce bien que diferentes medios son selectivos, lo que significa que promueven el crecimiento sólo de algunos tipos de célula. Los suplementos de los
- 20 medios tales como suero, cerebro pituitaria y otros extractos, son a menudo esenciales para el crecimiento de células en cultivo, y, adicionalmente, son frecuentemente responsables de determinar el fenotipo de las células en cultivo, es decir, son capaces de determinar la supervivencia celular o dirigir la diferenciación. El papel de los suplementos en procesos celulares, tal como la diferenciación es complejo y depende de su concentración, el punto de tiempo en el cual se añaden al cultivo, el tipo celular y el medio usado. La naturaleza indefinida de estos suplementos, y su potencial para afectar el
- 25 fenotipo celular, han motivado el desarrollo de medios libres de suero. Al igual que con todos los medios, su desarrollo ha sucedido en gran medida por ensayo y error como se discutió anteriormente.

- La fase gaseosa del cultivo de tejidos es además importante y su composición y el volumen que debe usarse puede depender del tipo de medio usado, la cantidad de tampón requerido, si el recipiente de cultivo está abierto o cerrado, y si
- 30 un proceso celular particular necesita modularse. Las variables comunes incluyen la concentración de dióxido de carbono y oxígeno.

- Otras condiciones importantes para el cultivo de tejidos incluyen la elección del recipiente de cultivo, la cantidad de espacio vacío, la densidad de inoculación, la temperatura, la frecuencia de cambios de los medios, el tratamiento con enzimas, la
- 35 tasa y el modo de agitación o agitador.

- La variación de las condiciones de cultivo celular, por lo tanto, es un método de lograr un proceso celular deseado. Un aspecto de la invención reconoce que la variación de las condiciones de cultivo celular de una manera en serie puede ser un método muy efectivo para lograr un efecto celular. En varias aplicaciones, por ejemplo, en estudios de diferenciación
- 40 celular, a menudo será el caso que se requiera una serie específica de diferentes condiciones de cultivo de tejidos para efectuar un proceso celular. Las diferentes condiciones pueden incluir adiciones o retiros a/desde los medios o el cambio de medios en puntos de tiempo específicos. Un conjunto de condiciones tales, ejemplos de las cuales se indican más adelante, se desarrollan comúnmente por ensayo y error como se ha discutido anteriormente.

- 45 Formación de unidades celulares

- Un aspecto importante es que los grupos de células (colonias celulares) pueden cultivarse en cultivo celular bajo diversas condiciones y que la colonia puede mantener en gran medida su integridad bajo diversas condiciones, cuando se desestabilizan, y cuando se mezclan con otras colonias. Estos grupos o colonias se denominan en la presente descripción
- 50 unidades celulares. La formación de unidades celulares puede conseguirse, a modo de ilustración, por el crecimiento de células como cultivos adherentes sobre sustratos sólidos tal como portadores. Si ocurre proliferación celular después de la siembra sobre los portadores, las células hijas se unirán en el mismo portador y formarán parte de la misma colonia. Generalmente, las células adherentes no se disocian fácilmente de su sustrato de crecimiento, por lo que la integridad de la colonia celular persiste a pesar de cualquier manipulación mecánica del portador, la agitación del medio de cultivo, o la
- 55 transferencia a otro sistema de cultivo de tejidos. Similarmente, si en cualquier momento múltiples portadores se colocan en el mismo recipiente (por ejemplo, se agrupan las perlas), entonces no habrá transferencia sustancial de células de una perla a otra.

- Una ventaja del crecimiento de las células en unidades o colonias es que si una unidad se coloca en serie en un conjunto de diferentes medios de cultivo de tejidos, entonces todas las células que comprenden la colonia se habrán expuesto a la
- 60 misma serie de condiciones de cultivo, en el mismo orden y por el mismo período de tiempo.

- Otra de las ventajas de este método es que el cultivo de tejidos puede miniaturizarse: se requieren relativamente pocas células para colonizar una perla microportadora (ver más adelante) en comparación con, incluso, el matraz de cultivo de
- 65 tejidos más pequeño.

El crecimiento de células en unidades, que no son necesariamente en sí mismas adherentes al recipiente de cultivo de tejidos, tiene la ventaja adicional que las colonias individuales pueden retirarse a voluntad y transferirse a un recipiente de cultivo diferente. Esto es particularmente importante ya que permite la transferencia de células diferenciadas que comprenden progenitores para placas de microtitulación adecuadas para la selección de fármacos. Así los progenitores pueden prepararse a granel - tal como mediante un método determinado previamente con el uso de la técnica descrita en WO2004/031369, y después las mismas unidades celulares se transfieren esencialmente mediante transferencia de líquido en la plataforma de HTS. Esto (i) facilita en gran medida el procedimiento de HTS, (ii) mantiene la organización (multi) celular en 3D de las unidades que puede ser integral para la diferenciación posterior, (iii) y obvia cualquier disociación de la organización celular que puede, en sí misma, causar diferenciación celular.

Una ventaja adicional del crecimiento de unidades celulares formadas sobre portadores es que el cultivo celular puede expandirse. El crecimiento de células madre sobre portadores ofrece una manera de expandir la producción para proporcionar material suficiente para la selección de alto rendimiento. La expansión de dichos cultivos celulares puede requerir al menos 1 g (peso seco) de microportadores - tal como 10g, 50g, o más. Otra ventaja importante de la formación de unidades celulares sobre sustratos sólidos es que el sustrato - y por lo tanto las células a causa de la asociación- pueden marcarse por diversos medios.

Se han usado ampliamente esferas de vidrio de 3 mm y 5 mm como sustratos de adhesión celular, particularmente en biorreactores de perlas de vidrio (por ejemplo tal como se fabrica por Meredos GmbH) usados para la expansión de los cultivos celulares. Estas perlas se usan, típicamente, en lechos empacados en lugar de cultivo discontinuo, para evitar daños mecánicos a las células adherentes. Aunque tales sustratos son adecuados para los propósitos de esta invención, otros portadores descritos más adelante pueden ser aún más convenientes.

Particularmente cuando las células se cultivan en portadores más pequeños, ellas puede tratarse como un cultivo en suspensión. Es importante destacar que un método común de las células que crecen en las compañías pequeñas se denomina cultivo celular en microportadores (ver 'Microcarrier cell culture, Principles and Methods', Edición AA, disponible de Amersham Biosciences (18-1140-62). Los cultivos de microportadores se usan comercialmente para la producción de anticuerpos e interfieren en fermentadores de hasta 4000 litros. Una variedad de microportadores está disponible, que varían en forma y tamaño y se fabrican de diferentes materiales. Los microportadores en perlas que se hacen de poliestireno (Biosilon, Nunc), vidrio (Bioglass, Solohill Eng), colágeno (Biospheres, Solohill Eng), DEAE sephadex (Cytodex-1, Pharmacia), dextrano (Dormacell, Pfeifer & Langen), celulosa (DE-53, Whatman), gelatina (Gelibead, Hazelton Lab), y DEAE dextrano (Microdex, Dextran Prod.) entre otros están disponibles comercialmente. Estos portadores están bien caracterizados en términos de la gravedad específica de las perlas, el diámetro y el área superficial disponible para el crecimiento celular. Adicionalmente un número de soportes (micro) porosos están disponibles con área superficial para el crecimiento celular muy aumentada. Una característica adicional de estos portadores porosos es que son adecuados para el crecimiento tanto de células dependientes del anclaje, así como también para las células en suspensión que se cargan por atrapamiento en la red de poros de interconexión, abiertos. Los portadores porosos están disponibles en materiales tales como gelatina (Cultispher G, Percell), celulosa (Cytocell, Pharmacia), polietileno (Cytoline 1 y 2, Pharmacia), caucho de silicona (Immobilisil, Ashby Scientific), colágeno (Microsphere, Cellex Biosciences), y vidrio (Siran, Schott Glassware). Estos portadores se adaptan diversamente a los sistemas de cultivo de lecho fijo o fluidizado, agitados.

Como las propiedades físicas de los portadores son bien conocidas es fácil calcular el número de portadores usados en un experimento. Algunos de los portadores descritos y muchos además están disponibles como productos secos que pueden pesarse con exactitud, y posteriormente prepararse mediante hinchamiento en medio líquido. Adicionalmente el número de células usadas para inocular un cultivo con microportadores puede calcularse y variarse. Por ejemplo, un cultivo de Cytodex 3 (2 g/litro) inoculado a 6 células por perla dará un cultivo que contiene 8 millones de microportadores, sobre los cuales se cultivan 48 millones de células/litro a una densidad de 5×10^4 células/cm².

Si es necesario, la recolección de células cultivadas sobre los microportadores o la liberación de marcadores de los microportadores (ver más adelante), puede lograrse por el desprendimiento enzimático de las células, y/o por digestión del portador donde sea pertinente: los portadores de gelatina pueden solubilizarse con tripsina y/o EDTA, los portadores de colágeno con el uso de colagenasa y los portadores de dextrano con el uso de dextranasa.

Adicionalmente a los microportadores sólidos o porosos, las células pueden agruparse por aprisionamiento, es decir, confinarse dentro de una barrera permeable al medio. Los sistemas de cultivo de membrana se han desarrollado donde una membrana de diálisis permeable retiene un grupo de células, pero permite que el medio de cultivo y sus constituyentes intercambien libremente con los compartimientos internos y externos. Además, se ha desarrollado el cultivo de células en cartuchos de fibras huecas, y una multitud de fibras e incluso sistemas llave en mano están disponibles comercialmente (por ejemplo de Amicon, Cellex Biosciences). Se ha desarrollado, además, la encapsulación de células en matrices semisólidas, donde las células se inmovilizan mediante adsorción, enlace covalente, reticulación o atrapamiento en una matriz polimérica. Los materiales que se han usado incluyen gelatina, polilisina, alginato y agarosa. Un protocolo típico, es mezclar agarosa al 5 % a 40 °C con una suspensión de células en su medio de crecimiento normal, para emulsionar la mezcla con el uso de un volumen igual de aceite de parafina y enfriar en un baño de hielo, lo que produce esferas de

80- 200 μm de diámetro. Estas esferas pueden separarse del aceite y transferirse al medio en un recipiente de cultivo de tejidos.

El atrapamiento celular es un método simple para la inmovilización de grupos de células, semejante al uso de microportadores o de sustratos porosos. Una técnica simple es entrapar células en fibras de celulosa, tales como DEAE, TLC, QAE, TEAE (todas disponibles de Sigma). Otros dispositivos más sofisticados son los cartuchos cerámicos que son adecuados para células en suspensión, como en el sistema de cultivo Opticel (Cellex Biosciences).

Un experto en la técnica concebirá adicionalmente a los métodos anteriores de crear unidades celulares, otros métodos de crear agrupaciones de células, que incluyen formar cultivos de células 3D, tales como esferas neurales o cuerpos embrioides, o usar tejidos, y de hecho, organismos enteros tales como *Drosophila* o *C. elegans*.

Las unidades celulares, o los sustratos de los que están compuestos, pueden asociarse con un factor particular que incluyen, pero sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos u otros productos químicos, tales como fármacos. El acondicionamiento previo de sustratos puede lograrse de muchas maneras, por ejemplo simplemente mediante la incubación del sustrato con el factor de interés o mediante unión covalente o no covalentemente del factor al sustrato. Los factores solubles pueden incorporarse, en materiales secos por impregnación. Esta técnica se basa en la rápida entrada de líquido, que lleva factores solubles, dentro del material poroso seco que concomitantemente se vuelve hinchado y listo para su uso. Los factores sólidos pueden incorporarse, por ejemplo, mediante la mezcla del factor en el fibrinógeno con una solución de trombina, en cuyo punto se forma un coágulo de fibrina que contiene el factor. Pueden concebirse otras múltiples formas de asociar el(los) factor(es) con un grupo celular, adicionalmente a la impregnación, atrapamiento o encapsulación del factor junto con las células.

Un método para asociar un grupo celular con un número de diferentes factores es preformar combinados de factores que, posteriormente, se asocian a un grupo celular particular. Un segundo método sería condicionar grupos celulares en serie en un número de factores. Como un ejemplo, usar formulaciones secas de sustratos de crecimiento de grupo celular, este método implicaría en primer lugar el hinchamiento parcialmente del sustrato en una solución, que contiene un primer factor y posteriormente hinchamiento adicional del mismo en una solución que contiene un segundo factor, lo que resulta en un sustrato al cual se han asociado ambos factores. Mediante la revisión de un protocolo sistemático de asociar grupos celulares con diferentes combinaciones de diferentes factores, será posible muestrear el efecto sobre el grupo celular de cualquier combinación de un conjunto de factores.

Independientemente del método usado para acondicionar las unidades celulares con los factores, los factores se toman por las células que componen esa unidad celular. Los factores que se filtran en el medio de crecimiento, se diluyen hasta tal punto que su concentración cae por debajo de los límites fisiológicamente pertinentes y no tienen ningún efecto sobre cualquier grupo celular adicional al que se expongan. La difusión hacia afuera del factor de por ejemplo, el sustrato que forma el puerto de la unidad celular se regula por parámetros tales como la naturaleza y dimensiones del material, el diámetro promedio de poros, y el peso molecular y concentración del factor. Para calibrar el proceso si es necesario, la liberación del factor puede medirse mediante ensayos físicos tales como análisis de HPLC o la liberación del factor marcado en el medio, o mediante ensayos biológicos, tales como el bioensayo de prolongaciones de ganglios de raíces dorsales para factores neurotróficos.

Serie combinatoria de cultivo de células

La invención se dirige además al problema que la técnica de cultivo celular que implica una pluralidad de etapas y agentes son difíciles, si no imposibles, de determinar mediante experimentación convencional, que en la técnica anterior ha implicado ensayo y error. La determinación empírica de la condición de cultivo de tejidos en procedimientos multietapas, complejo, no es factible en la práctica. Ventajosamente, las condiciones de cultivo necesarias para diferenciar un tipo de célula pueden, primero, identificarse con el uso de los métodos descritos, más adelante, en la presente descripción.

(a) Cultivo de células por división y agrupación

El cultivo por división y agrupación permite que las células se sometan a una serie de condiciones de cultivo, y se expongan a una serie de agentes en medios de cultivo, de una manera sistemática y muy productiva y se describe en detalle en el documento WO2004/031369.

La primera etapa del cultivo celular por división y agrupación es formar unidades celulares (particularmente unidades celulares microscópicas) ya que cada unidad celular constituye una unidad de fácil manipulación que puede exponerse a una variedad de condiciones de cultivo celular. Para simplificar, en esta discusión asumiremos que las agrupaciones de células se producen mediante crecimiento de las células en cultivo con microportadores, y los términos unidad celular, grupo celular, colonia y perla se usan de forma intercambiable. Sin embargo, los métodos descritos son igualmente aplicables a cualquier unidad celular. Un método particularmente eficiente para el muestreo de un gran número de condiciones de cultivo celular se conoce como cultivo celular combinatorio o cultivo celular por división y agrupación y en una modalidad implica la subdivisión en serie y la combinación de los grupos de unidades celulares para muestrear múltiples combinaciones de condiciones de cultivo celular. En un aspecto de la invención, el método funciona mediante la adopción de un cultivo inicial de partida (o cultivos de partida diferentes) de unidades celulares divididas en número de

- X_1 alícuotas que contienen cada una múltiples perlas (grupos/ colonias/portadores) que se cultivan separadamente bajo diferentes condiciones de cultivo. A continuación del cultivo de células durante un tiempo dado, las unidades celulares pueden agruparse mediante la combinación y mezcla de las perlas de las diferentes alícuotas. Esta agrupación puede dividirse de nuevo en número de X_2 alícuotas, cada una de las cuales se cultiva bajo condiciones diferentes durante un período de tiempo, y, además posteriormente se agrupan. Este procedimiento iterativo, de división, cultivo y agrupación (o agrupación, división y cultivo; en dependencia de donde uno entra en el ciclo) de unidades celulares permite el muestreo sistemático de muchas combinaciones diferentes de condiciones de cultivo de células. La complejidad del experimento, o en otras palabras el número de combinaciones diferentes de condiciones de cultivo de células a prueba, es igual al producto del número de condiciones diferentes ($X_1 \times X_2 \times \dots \times X_n$) que se muestrean en cada ronda. Tener en cuenta que la etapa de agrupar todas las unidades celulares previo a una división posterior puede ser opcional - una etapa en la que se agrupan un número limitado de unidades celulares puede tener el mismo efecto. Por tanto, la descripción engloba un número de métodos relacionados de muestrear sistemáticamente múltiples combinaciones de condiciones de cultivo de células, donde grupos de unidades celulares se manejan de forma masiva.
- Independientemente de la forma precisa en que una diversidad de condiciones de cultivo de células se muestrea por este medio, el procedimiento es eficiente debido a múltiples unidades celulares pueden compartir un solo recipiente, donde ellas se cultivan bajo condiciones idénticas, y puede llevarse a cabo con el uso de sólo unos pocos recipientes de cultivo en un momento dado (el número de recipientes de cultivo en uso es igual al número de muestras divididas). En muchos aspectos, el principio de este procedimiento se asemeja al de la síntesis dividida de grandes bibliotecas químicas (conocida como, química combinatoria), que muestrea todas las posibles combinaciones de vínculo entre los grupos de unidades estructurales químicas (ver por ejemplo: Combinatorial Chemistry, Oxford University Press (2000), Hicham Fenniri (Editor)). El cultivo de células por división y agrupación puede repetirse por cualquier número de rondas y cualquier número de condiciones pueden muestrearse en cada ronda. Siempre y cuando el número de unidades celulares (o perlas colonizadas en este ejemplo) es mayor o igual al número de diferentes condiciones muestreadas por todas las rondas, y si se asume que la división de las unidades celulares se produce totalmente al azar, se espera que habrá al menos una unidad celular que se haya cultivado de acuerdo con cada una de las diversas combinaciones de condiciones de cultivo muestreadas por el experimento. Este procedimiento puede usarse para muestrear las condiciones de crecimiento o de diferenciación de cualquier tipo de célula, o la eficiencia de la producción de biomoléculas (por ejemplo, producción de eritropoyetina o interferón) por cualquier tipo de célula. Debido a que el procedimiento es iterativo, este se ajusta idealmente para probar los protocolos de cultivo de tejidos de múltiples etapas - por ejemplo los descritos anteriormente en relación con la diferenciación de células madre. Las variables que pueden muestrearse con el uso de esta técnica incluyen el tipo de célula, agrupamiento celular (por ejemplo cultivo con microportadores, encapsulación de células, organismo completo), sustrato de crecimiento (por ejemplo fibronectina como microportador), duración de la ronda de cultivo de célula, temperatura, diferentes medios de cultivo (que incluyen diferentes concentraciones de constituyentes), factores de crecimiento, medios acondicionados, cocultivo con diversos tipos de células (por ejemplo, células alimentadoras), extractos animales o vegetales, fármacos, otros compuestos químicos sintéticos, infección con virus (incl. virus transgénicos), adición de transgenes, adición de moléculas antisentido o antígenos (por ejemplo ARNi, triple hélice), entradas sensoriales (en el caso de organismos), eléctrica, luz, o estímulos redox y otros.
- En una modalidad, las condiciones de cultivo necesarias para diferenciar el primer tipo de célula que se identifica primero en un método que comprende las etapas de: (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares que comprenden cada uno una o más células, y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas; (b) subdividir uno o más de dichos grupos para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares; (c) exponer dichos otros grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas adicionales; (d) opcionalmente, repetir las etapas (b)-(c); y (e) evaluar el efecto sobre una unidad celular dada de la condición de cultivo a la cual se ha expuesto.
- En otra modalidad, las condiciones de cultivo necesarias para diferenciar parcialmente o completamente el primer tipo de células que se identifican primero en un método que comprende las etapas de: (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares cada uno que comprende una o más células, y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas; (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar al menos una segunda agrupación; (c) subdividir la segunda agrupación para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares; (d) exponer dichos otros grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas; (e) opcionalmente, repetir las etapas (b) - (d); y (f) evaluar el efecto sobre una unidad celular dada de las condiciones de cultivo a las cuales se ha expuesto.
- Adecuadamente, las unidades celulares que están parcialmente diferenciadas se aíslan y usan en los métodos descritos en la presente descripción.
- Adecuadamente, las unidades celulares se etiquetan y la(s) etiqueta(s) refleja(n) las condiciones de cultivo a la cual la unidad celular se ha expuesto. La etiqueta puede estar espacialmente codificada. La etiqueta puede seleccionarse del grupo que consiste en un virus, un oligonucleótido, un péptido, un compuesto fluorescente, una amina secundaria, un halocarbono, una mezcla de isótopos estables, un código de barras, una etiqueta óptica, una perla, un punto cuántico y una etiqueta de codificación de radiofrecuencia o combinaciones que comprenden al menos dos de estas etiquetas. Dos o más etiquetas pueden seleccionarse y usarse en combinación para etiquetar una unidad celular.
- Adecuadamente, las células se cultivan en unidades celulares, cada unidad celular comprende una o más células. Las unidades celulares pueden ser células individuales. Cada unidad celular puede comprender una o más células adherentes

a o ligadas por un sustrato sólido. El sustrato sólido puede ser un microportador o perla. El sustrato sólido puede incluso ser un pocillo o una barrera permeable al medio.

En una modalidad, las condiciones de cultivo son medios a los que se expone la célula. Adecuadamente, los medios contienen uno o más agentes específicos que influyen sobre un proceso celular.

Las condiciones de cultivo de células pueden comprender cultivar a una o más temperaturas específicas o presiones parciales de oxígeno o dióxido de carbono. Las condiciones de cultivo de células pueden comprender cultivar sobre uno o más sustratos específicos.

(b) Cultivo de células por división y agrupación

El propósito de llevar a cabo los procesos de división y agrupación en unidades celulares es exponer sistemáticamente estas a una combinación predefinida de condiciones. El experto en la técnica concebirá muchos medios diferentes para lograr este resultado. Adicionalmente a los procesos de división y agrupación y variaciones de estos, merece la pena brevemente discutir los procesos de división y agrupación. Un proceso de división y agrupación implica subdividir un grupo de unidades celulares al menos dos veces, sin intervenir el agrupamiento de unidades celulares. Si los procesos de división y agrupación se usan por un gran número de rondas, el número de muestras separadas que se generan aumenta exponencialmente. En este caso, es importante emplear algún nivel de automatización, por ejemplo el uso de una plataforma robótica y sistemas de seguimiento de muestra sofisticados. La ventaja de las etapas subdivididas es que (ya que las unidades celulares están ávidas de combinarse) es posible segregar linajes de las diversas unidades celulares basado en su historia de cultivo celular. Por consiguiente las etapas subdivididas pueden usarse para deducir si una condición de cultivo celular particular es responsable de cualquier proceso celular dado, y por lo tanto, se usan para deducir la historia del cultivo de unidades celulares (que se explica en detalle en "Determination of culture history of a cell unit").

Protocolos predeterminados

La división y/o agrupamiento de las unidades celulares pueden llevarse a cabo totalmente al azar o pueden seguir un protocolo predeterminado. Cuando las unidades celulares se dividen y/o agrupan al azar, la segregación de una unidad celular dada en cualquier grupo no está predeterminada o parcializada de ninguna manera. Para dar lugar en una alta probabilidad, que al menos una unidad celular se haya expuesto a cada una de las posibles combinaciones de condiciones de cultivo celular, es ventajoso emplear un mayor número de unidades celulares que el número total de combinaciones de condiciones de cultivo celular que son probados. Bajo ciertas circunstancias, por lo tanto, es ventajoso dividir y/o agrupar unidades celulares de acuerdo con un protocolo predeterminado, el efecto general que es esa duplicación fortuita, u omisiones de combinaciones, se evitan. La manipulación predeterminada de unidades celulares puede planearse, opcionalmente, de antemano y registrarse en una hoja de cálculo o programa de ordenador, y dividir y/o agrupar operaciones ejecutadas con el uso de protocolos automatizados, por ejemplo robóticos. El etiquetado de unidades celulares (ver más adelante) puede ser por cualquiera de un número de medios, por ejemplo mediante el etiquetado por RFID, etiquetado óptico o codificación espacial. Los dispositivos robóticos capaces de determinar la identidad de una muestra, y por lo tanto, de particionar las muestras de acuerdo con un protocolo predeterminado, se han descrito (ver 'Combinatorial Chemistry, A practical Approach', Oxford University Press (2000), Ed H. Fenniri). Alternativamente, la manipulación estándar de laboratorio de líquidos y/o la robótica del cultivo de tejidos (por ejemplo tal como el fabricado por: Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA; The Automation Partnership, Royston, UK) es capaz de codificar espacialmente la identidad de múltiples muestras y de añadir, eliminar o translocar estos de acuerdo con protocolos preprogramados.

Análisis y/o separación de unidades celulares

A continuación de cada ronda de cultivo celular, o después de un número definido de rondas, las unidades celulares pueden estudiarse para observar cualquier proceso celular dado que puede haberse afectado por las condiciones de cultivo de tejidos. Los ejemplos más adelante son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

A continuación de cada ronda de cultivo celular, o después de un número definido de rondas, las unidades celulares pueden ensayarse para determinar si hay miembros que muestran aumento de la proliferación celular. Esto puede lograrse mediante una variedad de técnicas, por ejemplo mediante inspección visual de las unidades celulares bajo un microscopio, o mediante cuantificación de un producto marcador característico de la célula. Este puede ser un marcador endógeno, tal como una secuencia particular de ADN o una proteína celular que puede detectarse por un ligando o un anticuerpo. Alternativamente un marcador endógeno, tal como la proteína fluorescente verde (GFP), pueden introducirse en las unidades celulares que se ensayaron para proporcionar una lectura específica de las células (vivas). Las células vivas pueden visualizarse mediante el uso de una variedad de tinciones vitales, o por el contrario las células muertas pueden etiquetarse mediante el uso de una variedad de métodos, por ejemplo con el uso de yoduro de propidio. Además, las unidades celulares etiquetadas pueden separarse de las no etiquetadas por una variedad de técnicas, tanto manuales como automatizadas, que incluyen la purificación por afinidad ("inmunoselección"), o por separación celular activada por fluorescencia (FACS) o técnicas ampliamente similares. En dependencia de la aplicación, puede ser posible usar el equipamiento estándar de laboratorio, o puede ser ventajoso usar instrumentación especializada. Por ejemplo, ciertos análisis e instrumentos de separación (por ejemplo, ver Union Biometrica Inc., Somerville MA, Estados Unidos) tienen

diámetros de circulación de células de hasta un milímetro, lo cual permite la separación por circulación de las perlas con diámetros de hasta 500 micras. Estos instrumentos proporcionan una lectura del tamaño y densidad óptica de la perla, así como también dos longitudes de onda de emisión fluorescente de las etiquetas, tales como GFP, YFP o DS-red. Las velocidades de separación de 180,000 perlas por hora y la dispensación en placas de múltiples pocillos o en un receptor global son posibles.

A continuación de cada ronda de cultivo celular, o después de un número definido de rondas, las unidades celulares pueden ensayarse para determinar si hay miembros que exhiben un genotipo o fenotipo particular. La determinación del genotipo puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas conocidas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación in situ fluorescente (FISH), la secuenciación del ADN, y otros. La determinación del fenotipo puede llevarse a cabo por una variedad de técnicas, por ejemplo mediante inspección visual de las unidades celulares bajo un microscopio, o mediante la detección de un producto marcador característico de la célula. Este puede ser un marcador endógeno, tal como una secuencia particular de ADN o de ARN, o una proteína celular que puede detectarse por un ligando, la conversión de un sustrato enzimático, o un anticuerpo que reconoce un marcador fenotípico particular (Por ejemplo ver Apéndice E de *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. US Department of Health and Human Services. junio 2001. Un marcador genético puede, además, ser exógeno, es decir, uno que se ha introducido en la población de células, por ejemplo mediante transfección o transducción viral. Ejemplo de marcadores exógenos son las proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) o antígenos de superficie celular que no se expresan normalmente en un linaje celular particular o que se modifican por epítopos, o de una especie diferente. Un transgén o gen marcador exógeno con elementos de control transcripcional asociados puede expresarse en una manera que refleja un patrón representativo de un(os) gene(s) endógeno(s). Esto puede conseguirse mediante la asociación del gen con un promotor mínimo específico del tipo de células, o mediante la integración del transgén en un locus particular (por ejemplo ver patente europea núm. EP 0695351). Las unidades celulares etiquetadas pueden separarse de las no etiquetadas por una variedad de técnicas, tanto manuales como automatizadas, que incluyen la purificación por afinidad ('inmunoselección'), o por separación de células activada por fluorescencia (FACS). Nishikawa y otros (1998, *Development* vol 125, págs.1747-1757) usaron marcadores de superficie celular reconocidos por anticuerpos para seguir la diferenciación de células ES totipotentes de murino. Con el uso de FACS ellos fueron capaces de identificar y purificar las células del linaje hematopoyético en varias etapas de su diferenciación.

Una alternativa o técnica complementaria para enriquecer unidades celulares de un genotipo o fenotipo particular es seleccionar genéticamente los grupos deseados. Esto se puede lograr por ejemplo mediante la introducción de un marcador seleccionable en las unidades celulares, y ensayar la viabilidad bajo condiciones selectivas, por ejemplo ver Soria y otros (2000, *Diabetes* vol. 49, pág. 1-6) quienes usaron un sistema tal para seleccionar células secretoras de insulina de las células ES diferenciadas. Li y otros (1998, *Curr Biol* vol 8, pág. 971-974) identificaron progenitores neurales mediante la integración de la selección bifuncional marcador/ β geo indicador (que proporciona para la actividad de β -galactosidasa y resistencia a G418) en el locus Sox2 por recombinación homóloga en células ES de murino. Dado que una de las características de los progenitores neurales es la expresión de Sox2, y por lo tanto los genes marcadores integrados, estas células podrían seleccionarse de linajes no neuronales mediante la adición de G418 después de inducir la diferenciación con el uso de ácido retinoico. La viabilidad celular podría ser determinada por inspección bajo un microscopio, o por control de la actividad β -gal. A diferencia de los enfoques de selección basada en el fenotipo, que pueden estar limitadas por la disponibilidad de ligando o anticuerpo apropiados, la selección genética puede aplicarse a cualquier gen expresado de forma diferente.

Microportadores

Una variedad de microportadores están disponibles, que varían en forma y tamaño y se fabrican de diferentes materiales.

A modo de ejemplo, el microportador puede ser un microportador poroso que se selecciona del grupo que consiste en microportador Cytopore (por ejemplo un microportador Cytopore 1 o un microportador Cytopore 2), un microportador Cultispher, un microportador Cultispher-G, un microportador Cultispher-GL y un microportador Cultispher-S, un microportador Informatrix, un microportador Microsphere, un microportador Siran, y un microportador Microporous MC.

A modo de ejemplo adicional, el microportador puede ser un microportador sólido - tal como un microportador Cytodex (por ejemplo un microportador Cytodex 1, Cytodex 2 o microportador Cytodex 3) un microportador Biosilon, un microportador Bioglass, un microportador FACT III o un microportador DE 52/53.

El cultivo en microportadores tiene ventajas significativas, que incluyen el escalado de los cultivos, y además permite que las unidades de células madre se expongan a condiciones de cultivo seleccionadas según sea necesario para obtener el crecimiento y/o condiciones de diferenciación deseados.

Las superficies de los microportadores pueden estar modificadas adicionalmente por tratamientos físicos o químicos, como la adsorción o la reticulación covalente de entidades moleculares con un carga deseada u otra característica deseada.

Microportadores Cultispher

CultiSpher se fabrica a partir de gelatina porcina de calidad farmacéutica a través de un proceso que produce una matriz de gelatina altamente reticulada con alta estabilidad mecánica y térmica. Cuando se usa en cultivos celulares, las células pueden adherirse tanto a la superficies externas como internas de la matriz. El aumento del área de superficie de la matriz junto con la protección de la tensión proporcionada a las células en el interior de la matriz, resulta en la capacidad mejorada de producción de células. Una ventaja adicional del producto es que la matriz puede disolverse con enzimas proteolíticas, lo que resulta en la recolección de células con casi 100 % de viabilidad.

En una modalidad, el microportador es un microportador CultiSpher-G. CultiSpher-G tiene un diámetro de partícula de 130-380 µm, un volumen de 12-18 ml/g seco, una densidad de 1,04 g/ml con un diámetro promedio de poro de 20 µm.

Para preparar y usar microportadores CultiSpher-G, puede hacerse referencia a *inter alia* Biotech. Bioeng. (2000) 68, 1 págs. 59-70; Brit. J. Cancer. Suppl. XXVII, S-78-S82 (1996); y el sitio web del fabricante en www.percell.se.

15 *Microportador Cytopore 2*

Los microportadores Cytopore, están disponibles de GE Healthcare (previamente Amersham) (www.microcarriers.com). Cytopore se hace de 100 % de celulosa, que es no tóxica para las células y biodegradable. Está cargado positivamente, debido a los grupos N,N,-dietilaminoetilo. Tiene una distribución del tamaño de partículas muy precisa y una estructura de red, la relación del área superficial con el material de partícula es más de 95 a 1. La estructura de red permite a las células teñidas ser observadas estrechamente mientras crecen dentro de los microportadores. El diámetro de partícula típico es 200-280 µm y el área superficial efectiva es 1,1 m²/g seco. La densidad relativa es 1,03 g/ml, el diámetro promedio de las aberturas de los poros es 30 µm y el volumen es 40 ml/g seco. Para preparar y usar microportadores Cytopore se hace referencia a *inter alia* *Applied Microbiology and Biotechnology* (1997) 47, 4 págs. 352-7; *Cytotechnology* (1999) 30 págs. 143-147; *Chinese Journal of Biotechnology* (1999) 15, 4 págs. 239-44 y *Acta Oto-Laryngologica* (2002) 122, 5 pág. 541-5.

Cytopore 2 se ha optimizado para células dependientes del anclaje que requieren una densidad de carga alrededor de 1,8 meq/g.

En algunas modalidades, el microportador es un microportador de gelatina porcina.

En algunas modalidades, el microportador se hace de 100 % de celulosa.

En una modalidad, las células diferenciadas pueden obtenerse de células madre *in vitro* mediante un método que comprende las etapas de: (a) cultivar células madre adherentes a microportadores en un medio de cultivo; (b) transferir los microportadores de un medio de cultivo a otro; (c) opcionalmente repetir la etapa (b) según se requiera; y (d) obtener las células diferenciadas adheridas a los microportadores.

Las células madre o células parcialmente diferenciadas puede exponerse a un modulador potencial, mientras todavía están adheridas a dicho microportador. La invención proporciona así un método para el uso de estas células en HTS mientras todavía están adheridas al microportador, tal como la realización de etapas de transferencia de células por medio de la robótica. Las células diferenciadas pueden aislarse por separación enzimática del microportador. Las células diferenciadas pueden aislarse por digestión del microportador.

Los métodos de la invención pueden practicarse con el uso de más de 50 g de peso seco del microportador.

Las células madre pluripotentes pueden cultivarse *in vitro* por un método que comprende las etapas de: (a) sembrar dichas células en microportadores; y (b) propagar las células mientras están adheridas a los portadores.

Determinación de la historia de identidad o del cultivo celular de una unidad celular

Cuando la manipulación de un gran número de unidades celulares, su identidad y/o la historia del cultivo celular (por ejemplo, la cronología y la naturaleza exacta de una serie de condiciones de cultivo a las que cualquier grupo o unidad pueden haber estado expuestos) puede hacerse confuso. Por ejemplo, el protocolo de división y agrupación del cultivo celular implica necesariamente mezclar unidades celulares en cada ronda, lo que hace difícil seguir las unidades individuales. La determinación de la historia del cultivo celular de una unidad celular en una mezcla de unidades celulares que se han sometido a múltiples condiciones de cultivo, se refiere a veces como 'desconvolución' de la historia de cultivo celular. Un método de hacer esto es etiquetar unidades celulares y por lo tanto es ventajoso etiquetar las unidades celulares. El etiquetado puede realizarse al comienzo de un experimento o durante cada ronda de un experimento y puede implicar una etiqueta única (que puede o no modificarse en el curso de un experimento) o una serie de etiquetas que comprenden un agregado único. Similarmente, la lectura de la(s) etiqueta(s) puede tener lugar durante cada ronda o simplemente al final del experimento. En una modalidad, las etiquetas únicas, tales como las etiquetas RFID se leen durante cada ronda, mientras que las etiquetas añadidas en serie en cada ronda se leen al final de un experimento.

El etiquetado de unidades celulares puede conseguirse mediante una variedad de medios, por ejemplo etiquetar tanto las

células mismas como cualquier material al que se unen las células o de cualquier manera se asocian. Cualquiera de los métodos químicos y no química usados para codificar bibliotecas combinatorias sintéticas pueden adaptarse para este propósito y algunos de estos se describen en *Methods in Enzymology* Vol 267 (1996), 'Combinatorial Chemistry', John N. Abelson (Editor); *Combinatorial Chemistry*, Oxford University Press (2000), Hicham Fenniri (Editor); K. Braeckmans y otros, 'Scanning the code', *Modern Drug Discovery* (Feb. 2003); K. Braeckmans y otros, 'Encoding microcarriers: Present and Future Technologies'; *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, págs. 447-456 (2002). Algunos ejemplos de métodos de etiquetado siguen.

Un método de etiquetado de unidades celulares implica asociar las unidades celulares con una etiqueta que se vuelve secuencialmente modificada a medida que se coloca en diferentes condiciones de cultivo. Esto puede implicar, por ejemplo, la adición o sustracción de más unidades con la etiqueta tal que su estereoquímica, secuencia o masa se altera; o la alteración de la memoria electrónica como en los transpondedores RF de lectura y escritura (ver más abajo).

Otro método de etiquetado de unidades celulares implica asociar secuencialmente etiquetas únicas a las unidades celulares cuantas veces se cultiven bajo condiciones diferentes, tal que la detección posterior y la identificación de las etiquetas proporciona para un registro inequívoco de la cronología e identidad de las condiciones de cultivo celular a la que la unidad celular se ha expuesto. Las etiquetas pueden absorberse por las células, o unirse a la superficie celular mediante adsorción, o un anticuerpo o ligando, o conjugarse a una matriz asociada a la célula, tales como un portador mediante adsorción, fuerzas coloidales o una variedad de vínculos tales como enlace covalente o enlace no covalente, por ejemplo, el enlace biotina-estreptavidina. Por ejemplo, una etiqueta simple que puede introducirse a las células o unirse a una matriz asociada a las células es un oligonucleótido de longitud y/o secuencia definidas.

Los oligonucleótidos pueden comprender cualquier clase de ácido nucleico (por ejemplo ARN, ADN, PNA, lineal, circular o viral) y pueden contener secuencias específicas para la amplificación. (por ejemplo, secuencias cebadoras para PCR) o etiquetas para la detección (por ejemplo, fluoróforos o atenuadores, o etiquetas isotópicas). La detección de estos puede ser directa, por ejemplo mediante secuenciación de los oligos o mediante su hibridación a secuencias complementarias (por ejemplo, en una matriz o chip) o indirecta, como por el control de un producto génico codificado por el oligonucleótido, o la interferencia del nucleótido con una actividad celular (por ejemplo, la inhibición antisentido de un gen particular). Un método ventajoso de amplificar ácidos nucleicos es mediante amplificación por círculo rodante (RCA; 2002, V. Demidov, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2(6), págs. 89-95) donde las etiquetas del ácido nucleico pueden comprender moldes para RCA, cebadores de alargamiento o puntales que ayudan a la circularización de los moldes en minicírculos).

Cualquier etiqueta molecular o macromolecular puede usarse siempre que se pueda detectar, que incluyen etiquetas peptídicas, compuestos coloreados o fluorescentes, aminos secundarios, halocarbonos, mezclas de isótopos estables etc. Las etiquetas pueden adherirse a unidades celulares directamente o mediante un intermediario, por ejemplo un anticuerpo generado contra un componente de la unidad celular, o a través de un par de interacción tal como biotina-estreptavidina. Adicionalmente las etiquetas pueden protegerse frente a la degradación por los componentes del cultivo celular, por ejemplo, por modificación química o de otro tipo o mediante encapsulación. La encapsulación de etiquetas puede tener lugar en muchos medios diferentes, por ejemplo, en perlas, muchos tipos de los cuales están disponibles de proveedores tales como Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, Estados Unidos), y la encapsulación puede usarse para estandarizar la dosis de etiqueta, adicionalmente a proporcionar componentes para la amplificación de la etiqueta y/o detección (por ejemplo, al proporcionar cebadores de PCR para uso con una etiqueta de ADN). Un método de etiquetado de unidades celulares emplea perlas fluorescentes tal como las fabricadas por Luminex Corporation (Austin, TX, Estados Unidos). El sistema Luminex comprende perlas de poliestireno que pueden o no derivatizarse externamente (por ejemplo, con avidina o anticuerpo) y se tiñen internamente con relaciones que difieren de dos fluoróforos espectralmente distintos, y un lector que es capaz de caracterizar la señal espectral de cada perla. Un método adicional emplea perlas tales como las fabricadas por Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, Estados Unidos). El sistema Bangs comprende conjuntos de perlas que pueden distinguirse basado en tamaños que difieren (por ejemplo, conjuntos de perlas de 4,4 μm y 5,5 μm de diámetro). Las perlas dentro de cada conjunto pueden, además, distinguirse entre sí basado en intensidades que difieren de fluorescencia debido a la carga diferencial con un solo colorante fluorescente. Es posible usar muchos colorantes diferentes con diferentes características de absorción o de emisión, que pueden cargarse internamente o adherirse externamente a los portadores mediante una multiplicidad de medios. Es posible además usar los 'puntos cuánticos' para obtener un número muy elevado de diferentes etiquetas fluorescentes que pueden leerse convenientemente.

Los sustratos de crecimiento de células tales como los descritos en relación con las unidades celulares pueden derivatizarse o revestirse con sustancias que facilitan el etiquetado y no interfieren con el crecimiento celular. Un método de derivatizar portadores es modificarlos covalentemente o no covalentemente con biotina, a la que una etiqueta puede adherirse a través de estreptavidina o avidina. Generalmente, será importante usar una etiqueta que no inducirá por sí misma un efecto celular (es decir, una etiqueta inerte) y que pueda distinguirse de las moléculas presentes en las unidades celulares o el medio de cultivo, y que pueda adherirse a su objetivo y, posteriormente, detectarse en el fondo de tales moléculas. Para facilitar la detección, puede ser ventajoso eluir selectivamente las etiquetas de las unidades celulares o desprender las células de las unidades celulares con el uso de condiciones selectivas. Pueden preverse estrategias de etiquetado molecular más complicadas, que incluyen la estrategia de 'codificación binaria' donde la información se registra por un conjunto de códigos binarios asignados a un conjunto de etiquetas moleculares y sus mezclas.

La detección de etiquetas puede conseguirse mediante una variedad de métodos familiares para los expertos en la

técnica. Los métodos incluyen la espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, secuenciación, hibridación, detección de antígenos, electroforesis, espectroscopía, microscopía, análisis de imágenes, detección de fluorescencia, etc.

5 De particular interés son las estrategias de etiquetado o codificación en las cuales el etiquetado se lleva a cabo sólo una vez, o donde el etiquetado y/o detección no son físicos y por lo tanto no invasivos. La identificación de radiofrecuencia (RFID) es un ejemplo de un sistema que muestra estas propiedades. La RFID emplea transpondedores (etiquetas RF), antenas y lectores. Una etiqueta RF es un circuito electrónico pequeño, usualmente encerrado en vidrio o plástico, que en su forma más simple proporciona acceso a un código de identificación único que puede 'leerse', sin contacto o línea de visión, por electrónica adecuada. Las etiquetas pueden, además, almacenar información generada por el usuario, de nuevo sin contacto o línea de visión. Un 'lector' es una unidad electrónica que transfiere información hacia y desde una o más etiquetas (debe tenerse en cuenta que el término lector se usa indistintamente para significar tanto una unidad de solo lectura como de lectura/escritura). El tamaño y características de un lector pueden variar considerablemente, y este puede operar de forma aislada, o estar conectado a un sistema de ordenador remoto. Una antena se usa para transmitir información de un lector a una etiqueta y para recibir información enviada por una etiqueta RF. El tamaño y formato de una antena reflejarán la aplicación específica, y pueden variar desde una pequeña bobina circular hasta grandes estructuras planas. Un sistema RFID puede operar de forma aislada, o estar conectado a un ordenador remoto para una interpretación más completa y manipulación de identificación y datos asociados derivados de una etiqueta. Una estrategia RFID usada en la química combinatoria se describe en Nicolaou y otros (1995, *Angew Chem Intl Ed Engl*, vol. 34, pág. 2289) y comprende:

10 (i) un recinto poroso que contiene un sustrato de síntesis y la etiqueta semiconductor; (ii) la resina de síntesis en fase sólida; (iii) una unidad semiconductor de una sola o múltiple etiquetas de radiofrecuencia, direccionable, encerrado en vidrio, capaz de recibir, almacenar y emitir señales de radiofrecuencia. Un dispositivo similar podría adaptarse al crecimiento y seguimiento de unidades celulares simplemente mediante reemplazo de la resina de síntesis en fase sólida con microportadores de cultivo de tejidos o unidades celulares adecuadas. Más variaciones de esto pueden preverse, que incluyen, pero sin limitarse a las etiquetas de RF (revestidas o no revestidas) en las que las células se cultivan directamente o etiquetas de RF implantadas en unidades celulares u organismos.

15

20

25

30 Así las etiquetas no tienen necesariamente que distinguirse por su estructura química o molecular en primera instancia. Múltiples variaciones de la estrategia de etiquetado no químico pueden idearse para determinar la identidad de una unidad celular dada en una mezcla o para deducir la identidad de las diferentes unidades celulares que comprenden una mezcla. Para los métodos ópticos o visuales de etiquetado se han descrito donde diferentes objetos conformaos, objetos gráficamente codificados o diferentes colores indican la identidad de una muestra (por ejemplo, ver 1998, Guiles y otros, *Angew. Chem. Intl Ed Engl*, vol. 37, pág. 926; Luminex Corp, Austin TX, Estados Unidos; BD Biosciences; Memobead Technologies, Ghent, Bélgica), o donde un código de patrón o de barras está grabado sobre un sustrato, tal como una barra de cerámica o nanocables y se reconoce mediante el uso de tecnología de reconocimiento de patrones (por ejemplo, ver 1997, Xiao y otros, *Angew. Chem. Intl Ed Engl*, vol 36, pág. 780; SmartBead Technologies, Babraham, UK; Oxonica Ltd, Kidlington, Reino Unido).

35

40 Un método adicional de seguimiento o etiquetado de unidades celulares es codificar su identidad espacialmente, es decir, por su posición en el espacio. En este método unidades celulares diferentes se segregan en posiciones relativas definidas, y estas posiciones indican o codifican la identidad de las unidades. Por ejemplo, las unidades celulares pueden cultivarse en una matriz, con la cual se conoce la identidad y/o historia del cultivo de cada unidad y se asocia a una posición particular en la matriz. En sus formas más simples tales matrices pueden comprender colecciones de recipientes de cultivo de tejidos, pocillos de una placa de múltiples pocillos, o ubicaciones en un portaobjetos de vidrio u otra superficie. Ejemplos de estrategias de codificación de posición pueden encontrarse en Geysen y otros. (1984, *Proc Natl Acad Sci USA* vol. 81, págs. 3998-4002), Fodor y otros. (1991, *Science* vol. 251, págs. 767-773), Ziauddin y Sabatini (2001, *Nature*, Vol. 411, págs. 107-110), y Wu y otros. (2002, *Trends Cell Biol.* Vol. 12(10), págs.485-8).

45

50 Será evidente que no es necesario etiquetar todas las unidades celulares para ser capaz de deducir información acerca de las consecuencias resultantes de una combinación de protocolos de cultivo de células. Así, sin el etiquetado de unidades celulares todavía sería posible ensayar grandes combinaciones de condiciones de cultivo celular de acuerdo con la invención, y para determinar si una o más de estas fue capaz de dar como resultado un efecto celular particular. Sin embargo, en una modalidad, las unidades celulares están etiquetados. El etiquetado de una unidad celular permite la derivación de información útil del experimento respecto al resultado de las condiciones particulares muestreadas por la unidad celular etiquetada, en oposición a todas las unidades celulares. Alternativamente a veces es ventajoso etiquetar uno o un(os) poco(s) del(de los) grupo(s) de unidades celulares las cuales se han expuestos a un determinado protocolo de cultivo, por ejemplo, un grupo de unidades celulares que se han segregado en el mismo medio durante una etapa particular de división o agrupamiento. También será evidente que el etiquetado de determinadas unidades celulares permite PNE para inferir la identidad de otras unidades celulares (tal vez no marcados).

55

60

65 Similarmente, estará claro que la realización de experimentos de cultivo celular en los que se omitan varias condiciones pueden dar información con respecto a la utilidad de aquellas condiciones con respecto a un resultado experimental particular. Por tanto, sería posible evaluar cada una de las condiciones muestreadas mediante repetición del experimento un número de veces, en que se omite cada vez un conjunto diferente de condiciones.

Las etapas de división de cultivos celulares subdivididos pueden usarse, además, para determinar el efecto de un conjunto particular de condiciones sobre el resultado experimental. En etapas subdivididas de división resultan en la formación de linajes particulares de unidades celulares que se han expuesto a condiciones de cultivo celular únicas en el momento de la ramificación. Mediante el estudio de diferentes linajes es posible determinar la utilidad de las condiciones de cultivo de tejidos estudiadas en el punto de ramificación, con respecto a un resultado experimental particular.

Células hematopoyéticas

En un aspecto adicional, se proporciona un método para producir una célula hematopoyética a partir de una célula madre - tal como célula madre embrionaria *-in vitro* que comprende exponer dicha célula madre a una o más, preferentemente, dos o más, condiciones de reacción, en las que dichas condiciones de reacción comprenden incubar dicha célula madre con: (a) ácido retinoico, dimetilsulfóxido (DMSO) y/o factor de células madre (SCF); y (b) insulina, factor de células madre (SCF), TGF beta 1, BMP2, BMP4 y/o TPO; y (c) IL-3, IL-6, TPO, EPO y/o M-CSF.

La célula madre puede sembrarse en un microportador - tal como un microportador de gelatina.

Típicamente, las células madre están contenidas un medio - tal como IMDM basal (medio o Medio de Expansión Hematopoyética Stemline).

Adecuadamente, en la etapa (a) se usan ácido retinoico o dimetilsulfóxido (DMSO) o factor de células madre (SCF); adecuadamente en la etapa- (b) se usa insulina sola. Adecuadamente, en la etapa (b) se usan SCF, TGF beta 1, BMP2 y TPO. Adecuadamente, en la etapa (c) IL-3 e IL-6 se usan y, opcionalmente, se usan TPO, EPO y/o M-CSF.

Típicamente, la etapa (a) se lleva a cabo en el día 1. Típicamente, la etapa (b) se lleva a cabo en el día 4. Típicamente, la etapa (c) se lleva a cabo en el día 6.

En una modalidad específica, las condiciones son incubar las células madre con ácido retinoico, dimetilsulfóxido (DMSO), o factor de células madre (SCF); después incubar las células madre con insulina, factor de células madre (SCF), TGF beta 1, BMP2 o 4 y TPO o incubar las células madre con insulina sola y/o una combinación de SCF, TGF beta 1, BMP2 y TPO; y después incubar las células madre con IL-3, IL-6, y, opcionalmente, TPO, EPO y/o M-CSF.

En otra modalidad específica, las condiciones son en el día 1 incubar las células madre con ácido retinoico o dimetilsulfóxido (DMSO), o factor de células madre (SCF); en el día 4 incubar las células madre con factor de células madre (SCF), TGF beta 1, BMP2, BMP4 y TPO o incubar las células madre con insulina sola y/o una combinación de SCF, TGF beta 1, BMP2 y TPO; en el día 6 incubar las células madre con IL-3, IL-6, y, opcionalmente, TPO, EPO y/o M-CSF.

Aspectos adicionales

Otros aspectos de esta invención se presentan en los párrafos que se acompañan:

1. Un método para identificar un modulador potencial de una vía de señalización celular, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una célula de un primer tipo de célula en donde dicho primer tipo de célula puede diferenciarse a un segundo tipo de célula mediante la exposición, secuencialmente, de dicho primer tipo de célula a una o más condiciones de reacción;

(b) añadir a o sustituir al menos una de dicha una o más condiciones de reacción con la exposición a una o más condiciones de reacción diferentes que comprenden dicho modulador potencial; y

(c) controlar la diferenciación del primer tipo de células para determinar la formación del segundo tipo de célula.

2. Un método para identificar un modulador potencial de una vía de señalización celular, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una célula de un primer tipo de célula, en donde dicho primer tipo de célula se obtiene a partir de un embrión o feto y puede diferenciarse a un segundo tipo de célula;

(b) amplificar opcionalmente el dicho primer tipo de célula;

(c) Diferenciar aún más dicho primer tipo de célula mediante la exposición, secuencialmente, de dicho primer tipo de célula a una o más condiciones de reacción;

(d) exponer el primer tipo de célula a una o más condiciones de reacción diferentes que comprenden dicho modulador potencial; y

(e) controlar la diferenciación del primer tipo de célula para determinar la formación del segundo tipo de célula.

3. Un método de acuerdo con el párrafo 1 o 2, en donde las condiciones de reacción son las condiciones de cultivo a las que se exponen las células.

4. Un método de acuerdo con el párrafo 2 o 3, en donde el primer tipo de célula es una célula que se ha estancado a lo largo de una vía de diferenciación entre una célula madre y un tipo de célula diferenciada.

5. Un método de acuerdo con el párrafo 1 o 3, en donde el tipo de célula es una célula primaria, línea celular o línea celular derivada de un tumor.
- 5 6. Un método de acuerdo con el párrafo 4 o 5 en donde el tejido de origen del tipo de células se selecciona de un grupo que consiste en cerebro, corazón, hígado, pulmón, riñón, piel, cabello, ojos, dientes, páncreas, músculo, hueso y la vasculatura.
7. Un método de acuerdo con cualquier párrafo anterior, en donde el modulador potencial es un inhibidor de una vía de señalización celular.
- 10 8. Un método de acuerdo con los párrafos 1 a 6, en donde el modulador potencial es un promotor de una vía de señalización celular.
- 15 9. Un método de acuerdo con los párrafos 3 a 8, en donde las condiciones de cultivo necesarias para diferenciar un tipo de célula se identifican primero en un método que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares que comprende cada uno una o más células, y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas;
 - (b) subdividir uno o más de dichos grupos para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares;
 - (c) exponer dicho grupos adicionales a condiciones de cultivo adicionales deseadas;
 - 20 (d) opcionalmente, repetir las etapas (b)-(c) iterativamente, según sea necesario; y
 - (e) evaluar el efecto sobre una unidad celular dada de las condiciones de cultivo a las que se ha expuesto.
- 25 10. Un método de acuerdo con los párrafos 3 a 8, en donde las condiciones de cultivo necesarias para diferenciar parcial o totalmente un tipo de célula se identifican primero en un método que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar un primer conjunto de grupos de unidades celulares cada una que comprende una o más células, y exponer dichos grupos a condiciones de cultivo deseadas;
 - (b) agrupar dos o más de dichos grupos para formar al menos una segunda agrupación;
 - (c) subdividir la segunda agrupación para crear un conjunto adicional de grupos de unidades celulares;
 - (d) exponer dichos grupos adicionales a condiciones de cultivo deseadas;
 - 30 (e) opcionalmente, repetir las etapas (b) - (d) iterativamente según sea necesario; y
 - (f) evaluar el efecto sobre una unidad celular dada de las condiciones de cultivo a las que se ha expuesto.
- 35 11. Un método de acuerdo con el párrafo 9 o 10, en donde las unidades celulares que se diferencian parcialmente se aíslan después y se usan en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
12. El uso de un tipo de célula parcialmente diferenciada o en el párrafo 9 o 10 en el método de cualquier reivindicación precedente.
- 40 13. Un método de acuerdo con los párrafos 9 a 12 en donde las unidades celulares se etiquetan y la(s) etiqueta(s) refleja(n) las condiciones de cultivo a las que se ha expuesto la unidad celular.
14. Un método de acuerdo con el párrafo 13, en donde la etiqueta está codificada espacialmente.
- 45 15. Un método de acuerdo con el párrafo 13 o 14, en donde la etiqueta se selecciona del grupo que consiste en un virus, un oligonucleótido, un péptido, un compuesto fluorescente, una amina secundaria, un halocarbono, una mezcla de isótopos estables, un código de barras, una etiqueta óptica, una perla, un punto cuántico y una etiqueta de codificación de radiofrecuencia.
- 50 16. Un método de acuerdo con el párrafo 15, en donde dos o más etiquetas se seleccionan y se usan en combinación para etiquetar una unidad celular.
17. Un método de acuerdo con los párrafos 9 a 16, en donde las células se cultivan en unidades celulares, cada unidad celular que comprende una o más células.
- 55 18. Un método de acuerdo con el párrafo 9 a 16, en donde las unidades celulares son células individuales.
19. Un método de acuerdo con el párrafo 9 a 17, en donde cada unidad celular comprende una o más células adherentes a o delimitadas por un sustrato sólido.
- 60 20. Un método de acuerdo con el párrafo 19, en donde el sustrato sólido es un microportador o perla.
21. Un método de acuerdo con el párrafo 19, en donde el sustrato sólido es un pocillo o una barrera permeable al medio.
- 65 22. Un método de acuerdo con los párrafos 9 a 21, en donde las condiciones de cultivo son medios a los que la célula se expone.

23. Un método de acuerdo con el párrafo 22, en donde los medios contienen uno o más agentes específicos que influyen en un proceso celular,
- 5 24. Un método de acuerdo con los párrafos 3 a 23, en donde las condiciones de cultivo celular comprenden cultivar a una o más temperaturas específicas o presiones parciales de oxígeno o dióxido de carbono.
25. Un método de acuerdo con los párrafos 3 a 24, en donde las condiciones de cultivo celular comprenden cultivar sobre uno o más sustratos específicos.
- 10 26. Un método de acuerdo con cualquier párrafo anterior, en donde una primera célula se diferencia en un segundo tipo de célula mediante modulación de la señalización celular y/o expresión de uno o más genes en la célula.
- 15 27. Un método de acuerdo con el párrafo 26, en donde la modulación de la expresión génica en la célula comprende la transfección de dicho una o más genes en la célula.
28. Un método de acuerdo con el párrafo 26, en donde la modulación de la expresión génica comprende la administración exógena de un producto génico.
- 20 29. Un método de acuerdo con cualquier párrafo anterior en donde la diferenciación de la célula se controla mediante la observación del fenotipo de la célula o mediante la detección de la modulación de la expresión de uno o más genes en una célula, lo que determina, de ese modo, el estado de diferenciación de dicha célula.
- 25 30. Un método de acuerdo con el párrafo 29, en donde la modulación de la expresión de uno o más genes indicadores se observa en donde el(los) gen(es) indicador(es) responde(n) a uno o más estados de diferenciación de dicha célula.
31. Un método de acuerdo con el párrafo 29 o 30 en donde la expresión de genes implicados se controla en un chip génico.
- 30 32. Un método de acuerdo con el párrafo 29, en donde dicho uno o más genes codifican un marcador.
33. Un método de acuerdo con el párrafo 32, en donde dicho marcador puede detectarse mediante un inmunoensayo.
- 35 34. Un método de acuerdo con cualquier párrafo de método anterior en donde la diferenciación de una célula se controla por la pérdida de la capacidad proliferativa.
35. Un método de acuerdo con el párrafos 4 o 5 en donde las células madre o células que se han derivado partir de células madre in vitro, se cultivan mediante un método que comprende las etapas de:
40 a) combinar uno o más cultivos de células cultivadas bajo diferentes condiciones; y
b) cultivar las células.
36. Un método de acuerdo con el párrafo 35, en donde dichas células madre se someten al menos a un cambio de condiciones de cultivo.
- 45 37. Un método de acuerdo con el párrafo 36, en donde dicho cambio de condiciones de cultivo comprende un cambio de medio.
- 50 38. Un método de acuerdo con el párrafo 4 en donde las células diferenciadas se han obtenido a partir de células madre in vitro mediante un método que comprende las etapas de:
(a) cultivar células madre adherentes a microportadores en un medio de cultivo;
(b) Transferir los microportadores de un medio de cultivo a otro;
(c) opcionalmente, repetir la etapa (b) según sea necesario; y
(d) Obtener las células diferenciadas adheridas a la microportadores.
- 55 39. Un método de acuerdo con el párrafo 38, en donde las células madre o células parcialmente diferenciadas se exponen a dicho modulador potencial, mientras que todavía están adheridas a dicho microportador.
40. Un método de acuerdo con el párrafo 38, en donde las células diferenciadas se aíslan por desprendimiento enzimático del microportador.
- 60 41. Un método de acuerdo con el párrafos 38, 39 o 40 en donde el proceso se amplía tal que al menos 50 g (peso seco) del microportador se emplea.
- 65 42. Un método de acuerdo con el párrafos 38 o 41, en donde las células diferenciadas se aíslan por digestión del microportador.

43. El método de acuerdo con el párrafo 4 en donde células madre pluripotentes se han cultivado in vitro mediante un método que comprende las etapas de:
 - (a) sembrar dichas células sobre microportadores; y
 - (b) propagar las células mientras están adheridas a los portadores.
44. Un método de acuerdo con cualquier párrafo anterior en el que el modulador potencial comprende una pequeña molécula orgánica o inorgánica, un carbohidrato natural o derivatizado, proteína, polipéptido, péptido, glucoproteína, ácido nucleico, ADN, ARN, oligonucleótido o proteína-ácido nucleico (PNA).
45. Un método de acuerdo con cualquier párrafo anterior en donde el modulador potencial se obtiene a partir d una biblioteca de moléculas pequeñas con propiedades tipo de fármacos.
46. Uso de una biblioteca de compuestos para identificar un modulador potencial de acuerdo con cualquier párrafo anterior.
47. Una composición farmacéutica que comprende un modulador identificado de acuerdo con cualquier párrafo anterior junto con un portador farmacéuticamente aceptable; diluyente o excipiente.
48. Uso de un modulador identificado en cualquier párrafo precedente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad.
49. Uso de un modulador de acuerdo con el párrafo 48 en donde el tratamiento es una terapia de reemplazo celular.
50. Una célula parcialmente diferenciada, que se ha diferenciado in vitro a partir de una célula madre y se ha estancado a lo largo de una vía de diferenciación entre una célula madre y un tipo de célula diferenciada.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de un ejemplo, que se destina a servir para ayudar a un experto en la técnica en la realización de la invención, y no pretende de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

Ejemplo

Se realizó un cribado para identificar fármacos regenerativos capaces de estimular los linajes mieloides del sistema hematopoyético. El cribado se realizó mediante el uso de una serie de etapas de cultivo para diferenciar células madre embrionarias de ratón (mESC) sembradas sobre microportadores en progenitores de los linajes mieloides, y, posteriormente, someter a estos a condiciones de cultivo en presencia o ausencia de factores de crecimiento hematopoyético específicos de linaje TPO, M-CSF e IL-5, o el compuesto de control vitamina C, que se informa afecta a la supervivencia celular, pero no es un factor de crecimiento hematopoyético. Después de 48 horas, el efecto sobre la diferenciación celular mioide se evaluó mediante el uso de la aparición de los macrófagos como un ensayo sustituto. Este cribado identificó TPO y M-CSF como fármacos regenerativos hematopoyéticos capaces de estimular el linaje mioide.

Materiales y Métodos

Reactivos

Factor de células madre de murino (SCF) (R&D Systems)
trombopoyetina de murino (TPO) (R&D Systems)
eritropoyetina humana (EPO) (R&D Systems)
Interleucina humana 6 (IL-6) (R&D Systems)
factor de crecimiento transformante humano $\beta 1$ (TGF β -1) (R&D Systems)
factor estimulante de colonias de macrófagos de murino (M-CSF) (R&D Systems)
interleucina 3 de murino (IL-3) (R&D Systems)
ácido retinoico (Sigma)
proteína 2 morfogenética ósea humana (BMP2) (R&D Systems)
interleucina 5 de ratón (IL-5) ((R&D Systems)
ácido ascórbico (Vitamina C) (Sigma)

Microcultivo de mESC

Los microportadores CultiSpher-G (Percell Biolytica AB) se hidrataron y esterilizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Las células ES D3 (ATTC núm. CRL-1934) se cultivaron en plástico revestido de gelatina en KO-DMEM que contenía 15 % de suero de reemplazo de bloqueo (KOSR), 1 % de aminoácidos no esenciales (NEAA) 1 % de glutamax, 0,5 % de

penicilina/estreptomicina, 0,1 mM de D-mercaptoetanol (β -ME; Sigma) y 1000 U/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF; Chemicon); todos de Invitrogen a menos que se indique lo contrario.

En el día anterior al día 1 del experimento, aproximadamente $1,5 \times 10^4$ de microportadores biotinilados equilibrados en medio A (IMDM (Gibco), 15 % de KOSR, 1 % de NEAA, 0,5 % de pen/estrep, 0,1 mM de β -ME, 1000 U/ml de LIF y $1,5 \times 10^{-4}$ M de 1-tioglicerol (MTG; Stigma)) se añadieron a 100 ml de medio A que contenía aproximadamente $4,5 \times 10^6$ células ES, se dividieron en tres alícuotas equi colocados en pocillos de una placa Petri de 100mm cuadrados (Bibby Sterilin) y se incubaron durante la noche.

Preparación de los progenitores de mESC

Para preparar progenitores mieloides se empleó un método de dos etapas. Las perlas se sembraron con mESC como se describió anteriormente, se incubaron en IMDM que contenía 10^{-8} M de ácido retinoico durante 72h. Las perlas se lavaron después en PBS y se transfirieron a Medio de Expansión Hematopoyética Stemline™ (Sigma) que contenía 40 ng/ml de SCF, 2,5 ng de TGF- β 1-, 5 ng/ml de BMP2 y 20 nd/ml de TPO y se incubaron durante 48h.

Ensayo basado en células para fármacos regenerativos

Las perlas que portan progenitores mieloides preparadas como se describió anteriormente se mezclaron, lavaron en PBS y se transfirieron al Medio de ensayo de crecimiento (Medio de Expansión Hematopoyética Stemline™ (Sigma) complementado con 30 ng/ml de IL-3 y 20 ng/ml de IL-6). Alícuotas iguales de aproximadamente 100 perlas se dispensaron en los pocillos de una placa de 48 pocillos y se incubaron en presencia o ausencia de 50 μ g/ml de Vitamina C, 10 ng/ml de IL-5, 20 ng/ml de TPO y 20 ng/ml de M-CSF. El cribado se llevó a cabo por triplicado en pocillos de placas separadas colocadas en la misma incubadora.

Después de 48 h, 1 mg del reactivo de ensayo de macrófagos DQ-ovalbúmina (Molecular Probes) se constituyó en 0,4 ml de PBS y se añadió a cada pocillo a una dilución de 1:100. A continuación de la incubación durante al menos 4h, el medio se aspiró y reemplazó con PBS. Las muestras se examinaron en un microscopio epifluorescente Nikon TE2000-S invertido mediante el uso de un conjunto de filtros FITC para cuantificar microportadores que portan células grandes y redondas, etiquetadas internamente con fluorescencia verde.

Los resultados del cribado se informan como el número promedio (por ciento) de microportadores que se decoraron con macrófagos. En el Medio de Ensayo de Crecimiento solo (es decir, en ausencia de cualquier reactivo de ensayo) la conversión promedio en macrófagos fue de 1 %, que se tomó como el nivel basal de conversión en la diferenciación espontánea. Cuando se usó el compuesto control negativo de vitamina C como reactivo de ensayo, la conversión promedio en macrófagos fue 0 %, es decir, por debajo del nivel basal, lo que indica que no tuvo influencia en la diferenciación. Cuando se usó el factor de crecimiento hematopoyético IL-5 como reactivo de ensayo, la conversión promedio en macrófagos fue 0 %, es decir, también por debajo del nivel basal, lo que indica que no tuvo influencia sobre la diferenciación de las células mieloides en este ensayo. IL-5 se conoce por influir en el linaje hematopoyético linfoide pero no tiene efectos notables en la rama mieloides. Sin embargo, cuando se usó ya sea TPO o M-CSF como el reactivo de ensayo, la conversión promedio en macrófagos se incrementó en 6 %, lo que representa un aumento significativo sobre el basal.

Por tanto, este ensayo basado en mESC es capaz de identificar los reactivos que actúan para diferenciar los progenitores mieloides y por lo tanto podrían usarse para cribar bibliotecas de compuestos químicos para identificar fármacos regenerativos nuevos.

Reivindicaciones

1. Un método para identificar, un modulador potencial de una vía de señalización celular, en un cribado para identificar fármacos regenerativos, en donde el fármaco regenerativo actúa sobre una célula progenitora para formar una célula para reparar o para la regeneración de un tejido u órgano en un organismo, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una célula de un primer tipo de célula, en donde dicho primer tipo de célula puede diferenciarse en un segundo tipo de célula a través de una célula progenitora;
 - (b) derivar dicha célula progenitora *in vitro*, mediante exposición, secuencialmente, de dicho primer tipo de célula a uno o más medios de cultivo;
 - (c) exponer la célula progenitora derivada a dicho modulador potencial; y
 - (d) controlar la diferenciación para determinar la formación del segundo tipo de célula.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 para la identificación de un fármaco regenerativo que actúa sobre una célula progenitora para formar una célula para reparar o para la regeneración de un tejido u órgano en un organismo, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una célula de un primer tipo de célula que se diferencia en un segundo tipo de célula a través de una célula progenitora, en donde el tejido u órgano para reparar o regenerar comprende células del segundo tipo de célula;
 - (b) derivar dicha célula progenitora *in vitro*, mediante exposición, secuencialmente, de dicho primer tipo de célula a uno o más medios de cultivo;
 - (c) exponer la célula progenitora derivada a dicho modulador potencial; y
 - (d) controlar la diferenciación para determinar la formación del segundo tipo de célula.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde el primer tipo de célula se obtiene o es obtenible a partir de un embrión o feto, que excluye un embrión humano, y opcionalmente, se modifica para permitir la amplificación.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el primer tipo de célula es una célula madre de autorreinnovación.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las etapas de diferenciación se llevan a cabo en células que son parte de una unidad celular, preferentemente en donde la unidad celular comprende un microportador u otra armazón.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula progenitora es una célula que se ha estancado a lo largo de una vía de diferenciación entre una célula madre y un tipo de célula diferenciada.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el primer tipo de célula es una célula primaria.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el tejido de origen del tipo de célula se selecciona de un grupo que consiste en cerebro, corazón, hígado, pulmón, cabello, ojos, intestino, sangre, oído, riñón, piel, dientes, páncreas, músculos, huesos y vasculatura.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el modulador potencial es un inhibidor o un promotor de una vía de señalización celular.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde un primer tipo de célula se diferencia en un segundo tipo de célula mediante modulación de la señalización celular y/o la expresión de uno o más genes en la célula.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la modulación de la expresión génica en la célula comprende la transfección de dicho uno o más genes dentro de la célula o en donde la modulación de la expresión génica comprende la administración exógena de un producto génico.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la diferenciación del primer tipo de célula o la célula progenitora se controla mediante la observación del fenotipo de la célula o mediante la detección de la modulación de la expresión de uno o más genes en una célula, lo que determina, de ese modo, el estado de diferenciación de dicha célula.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la modulación de la expresión de uno o más genes indicadores se observa en donde el(los) gen(es) indicador(es) responde(n) a uno o más estados de diferenciación de dicha célula.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde dicho uno o más genes codifican un marcador.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho marcador puede detectarse por un inmunoensayo.
- 5 16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la diferenciación de una célula se controla por pérdida de la capacidad proliferativa.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el modulador potencial comprende una pequeña molécula orgánica o inorgánica, un carbohidrato natural o derivatizado, proteína, polipéptido, péptido, glucoproteína, ácido nucleico, ADN, ARN, oligonucleótido o proteína-ácido nucleico (PNA).
- 10 18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el modulador potencial se obtiene o es obtenible a partir de una biblioteca de moléculas pequeñas con propiedades tipo de fármacos.
- 15 19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula progenitora es una célula progenitora fisiológicamente relevante obtenible al:-
 - (a) identificar la célula del segundo tipo, referido como un fenotipo objetivo de interés y que es una célula del tejido u órgano;
 - (b) obtener células de un primer tipo;
 - (c) determinar un protocolo de diferenciación que conduce a la aparición del fenotipo objetivo a partir de células del primer tipo, a través de una célula progenitora; y
 - 20 (d) modificar el protocolo tal que el proceso de diferenciación se atasca en una fase en la cual las células progenitoras están presentes, lo que proporciona, de ese modo, dichas células progenitoras fisiológicamente relevantes.
- 25 20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula progenitora es una célula progenitora comprometida con el linaje, bipotente o unipotente.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la célula progenitora es una célula progenitora unipotente, comprometida con el linaje.
- 30 22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula progenitora tiene una capacidad de proliferación limitada.
23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cribado se usa en el descubrimiento de fármacos y comprende el descubrimiento de un compuesto líder, selección y optimización.
- 35 24. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el fármaco regenerativo es para la administración *in vivo*.
- 40 25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 23, en donde el fármaco regenerativo es para la administración *ex vivo*.
26. Un método para identificar un fármaco regenerativo, en donde el fármaco regenerativo actúa sobre una célula progenitora para formar una célula para reparar o para la regeneración de un tejido u órgano en un organismo, que comprende el uso de una célula progenitora, en donde dicha célula progenitora se diferencia a partir de un primer tipo de célula *in vitro* mediante la exposición, secuencialmente, de dicho primer tipo de célula a dos o más medios de cultivo.
- 45 27. Uso de una célula progenitora en un ensayo de selección de fármacos para identificar fármaco regenerativo actúa sobre una célula progenitora para formar una célula para reparar o para la regeneración de un tejido u órgano en un organismo, en donde dicha célula progenitora se diferencia a partir de un primer tipo de célula *in vitro* mediante la exposición, secuencialmente, de dicho primer tipo de célula a dos o más medios de cultivo.
- 50