

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 339**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2015 PCT/DK2015/050197**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16000721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2015 E 15745390 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3164709**

54 Título: **Identificación de compuestos que modifican un fenotipo celular**

30 Prioridad:

02.07.2014 DK 201400357

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

21.02.2019

73 Titular/es:

2CUREX APS (100.0%)

Birkevej 37

3460 Birkerød, DK

72 Inventor/es:

THASTRUP, OLE y

HAGEL, GRITH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 701 339 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

Identificación de compuestos que modifican un fenotipo celular

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método y a herramientas para obtener información relacionada a la influencia sobre un fenotipo celular o propiedad celular influida por un compuesto o una combinación de compuestos. En particular, el método se refiere a un soporte semi sólido que a través de múltiples cambios de fase permite la carga de compuestos y de células en el soporte, y ensayar la influencia de dichos compuestos sobre el sistema celular.

10 El método de la invención se puede emplear como un procedimiento muy eficaz para ensayar o descubrir la influencia de una biblioteca de compuestos sobre un proceso celular, por ejemplo, en relación con el cribado de nuevos fármacos, el ensayo de la eficacia o resistencia de compuestos individuales o de combinaciones de compuestos en células del paciente, el ensayo de la toxicidad de compuestos, e identificación de dianas farmacológicas para compuestos nuevos o conocidos. Otros usos útiles del método y de la tecnología de la invención serán evidentes para el experto en base a la siguiente divulgación.

Antecedentes de la invención

15 Una gran población de pacientes con cáncer no responden eficazmente al tratamiento médico ofrecido como monoterapia o adyuvante de la terapia de cirugía o radiación (artículo de Ernst y Young 2009: Lack of Drug responsiveness). En las últimas etapas del cáncer, un tratamiento médico no eficaz puede ser devastador para el pronóstico general.

20 El concepto de diseñar un tratamiento específico para el paciente individual se impulsó en los primeros días del proyecto del genoma humano donde se pensó que la elucidación del genoma humano abriría la "huella genética" para la progresión de la enfermedad y la sensibilidad del tratamiento de pacientes individuales. El genotipado de pacientes ha demostrado ser eficaz en la identificación de pacientes que responden a fármacos de diana única como Herceptin (expresión de HER-2/neu) y Erbitux/Tarceva (mutación KRAS). Sin embargo, este no ha sido el caso cuando se intenta imitar terapias de combinación específica para pacientes individuales.

25 La realización del análisis funcional celular in-vitro en células extirpadas de un paciente (por ejemplo, un paciente con cáncer) ha demostrado que existe una correlación altamente significativa entre la resistencia farmacológica y el efecto en el paciente (Mechetner E, Brünner N, Parker RJ. Scand J Gastroenterol. (2010) 9 de Agosto; d'Amato et al. Ann. Surg. Oncol. (2009), 16, 2848).

30 Para recopilar el comportamiento fisiológico y fisiopatológico de células cancerosas primarias in-vitro se reconoce que las células deberían cultivarse en cultivos tri-dimensionales (Sato et al. (2011), 141:1762-1772; Gastroenterology Godugu C, Patel AR, Desai U, Andey T, Sams A, et al. (2013), PLoS ONE 8(1): e53708).

Tardiff y Lindquist, 2013, Drug Discovery Today: Technologies, vol. 10. nº 1, p. e121-e128 describe cribados fenotípicos para compuestos que se dirigen a patologías celulares subyacentes de la enfermedad de Parkinson.

35 Cosmo Bio Co Ltd "Instructions for Mebiol Gel", 2003 describe el Gel Mebiol como un gel termorreversible para el cultivo celular en 3D y otras aplicaciones.

Compendio de la invención

40 Las células primarias son susceptibles, y por lo tanto, se deberían someter sólo al menor número de etapas de manipulación posible. Además, el acceso a las células primarias normalmente es limitado y para evitar la pérdida innecesaria de material celular es deseable la menor cantidad de etapas como sea posible. Además, para asegurar que las células primarias muestran el comportamiento lo más similar posible al comportamiento de las células in-vivo, se prefiere que las células se ensayen poco después de la extracción a partir del organismo intacto (pacientes ex.).

45 La presente invención proporciona métodos útiles para el ensayo in-vitro de cómo las células reaccionan a un grupo de compuestos o composición de compuestos, en donde los métodos requieren muy pocas etapas de manipulación. Además, los métodos permiten ensayar un gran grupo de compuestos o de combinaciones de compuestos diferentes empleando sólo un número limitado de células. Por tanto, los métodos son particularmente útiles para ensayar células susceptibles a muchas etapas de manipulación o células, con un suministro limitado.

50 Curiosamente, los métodos proporcionan los medios para el ensayo in-vitro de la influencia de un gran grupo de compuestos/combinaciones de compuestos de tal modo, que se recapitula el comportamiento fisiológico y fisiopatológico de las células primarias in-vitro cultivando las células en cultivos tri-dimensionales.

Además, los métodos permiten preparar matrices que comprenden compuestos/combinaciones de compuestos a ensayar, en donde las matrices se pueden empaquetar y transportar en un formato listo para usar. Por tanto, los métodos pueden ser muy simples de realizar por el usuario. Además, en realizaciones preferidas de la invención los

métodos aseguran que las células aparezcan en un campo visual estrecho que permite un ensayo fácil basado en la imagen.

Por tanto, en un aspecto la invención proporciona métodos para identificar un compuesto o una combinación de compuestos que modifican al menos un fenotipo celular, dicho método comprende las etapas de:

- 5 i) proporcionar una pluralidad de miembros de biblioteca, en donde cada miembro de biblioteca es un compuesto o una combinación de compuestos;
- ii) proporcionar una suspensión de células que pueden adquirir dicho fenotipo celular;
- iii) proporcionar un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar de un estado sol a un estado en gel
- 10 iv) proporcionar una matriz que contiene una pluralidad de espacios
- v) añadir dicho soporte en estado sol a los espacios de dicha matriz
- vi) añadir los miembros de la biblioteca a los espacios de dicha matriz, en donde al menos se añaden dos miembros de biblioteca diferentes a dos espacios diferentes, en donde las etapas v) y vi) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden,
- 15 vii) llevar el soporte al estado de gel;
- viii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células, mientras el soporte está en estado de gel; y
- ix) llevar el soporte al estado sol permitiendo de este modo que las células fluyan en el soporte; y
- x) llevar el soporte al estado de gel atrapando de ese modo a las células en el soporte; y
- 20 xi) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el mantenimiento y/o el crecimiento de las células,
- xii) detectar el fenotipo celular en las células,
- xiii) identificar los miembros de la biblioteca que modifican el fenotipo celular, identificando de ese modo un compuesto o una combinación de compuestos que modifican dicho fenotipo celular.

La invención proporciona también métodos para identificar un compuesto o una combinación de compuestos que modifican al menos un fenotipo celular, dichos métodos comprenden las etapas de:

- 25 i) proporcionar una biblioteca que contiene una pluralidad de miembros de biblioteca, en donde cada miembro de biblioteca es un compuesto o una combinación de compuestos;
- ii) proporcionar una suspensión de células que puede requerir dicho fenotipo celular;
- 30 iii) proporcionar un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar de un estado sol a un estado en gel
- iv) proporcionar una matriz que contienen una pluralidad de espacios
- v) añadir dicho soporte en estado sol a los espacios de dicha matriz
- vi) añadir los miembros de biblioteca a los espacios de dicha matriz, en donde se añaden al menos dos miembros de biblioteca diferentes a dos espacios diferentes,
- 35 en donde las etapas v) y vi) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden,
- vii) llevar el soporte al estado de gel;
- viii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células, y
- ix) llevar el soporte al estado sol, y
- en donde las etapas viii) y ix) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden,
- 40 x) llevar el soporte al estado de gel atrapando de este modo las células en el soporte; y
- xi) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el mantenimiento y/o el crecimiento de las células,
- xii) detectar el fenotipo celular en las células,

xiii) identificar los miembros de la biblioteca que modifican el fenotipo celular, identificando de ese modo un compuesto o una combinación de compuestos que modifican dicho fenotipo celular.

A pesar de no estar de acuerdo con la invención como se reivindica, la descripción proporciona también una matriz que comprende una pluralidad de pocillos, en donde un reservorio se conecta a cada uno de los pocillos; y en donde cada pocillo comprende un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar del estado sol al estado en gel; y en donde al menos 10 pocillos comprenden además miembros de biblioteca diferentes; y en donde cada miembro de biblioteca es un fármaco útil en el tratamiento del cáncer o una combinación de fármacos útiles en el tratamiento del cáncer.

Tal matriz es particularmente útil en los métodos de la presente invención.

Es también un aspecto de la invención proporcionar métodos para identificar un compuesto o una combinación de compuestos que modifican al menos un fenotipo celular, dicho método comprende las etapas de:

- i) proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de espacios, en donde cada espacio comprende un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar del estado sol al estado de gel; y en donde al menos 2 espacios comprenden además diferentes miembros de biblioteca; y en donde cada miembro de la biblioteca es un compuesto o una combinación de compuestos; y en donde el soporte está en el estado de gel;
- ii) proporcionar una suspensión de células que puede adquirir dicho fenotipo celular;
- iii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células; y
- iv) llevar el soporte al estado sol en donde las etapas ii) y iii) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden, permitiendo de este modo que las células fluyan en el soporte; y
- v) llevar el soporte al estado de gel atrapando de este modo las células en el soporte; y
- vi) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el mantenimiento y/o el crecimiento de las células
- vii) detectar el fenotipo celular en las células,
- viii) identificar los miembros de la biblioteca que modifican el fenotipo celular, identificando de este modo un compuesto o una combinación de compuestos que modifican dicho fenotipo celular.

Es también un aspecto de la invención proporcionar un método para predecir la eficacia del tratamiento de una afección clínica con cada uno de la pluralidad de miembros de la biblioteca en un individuo que padece dicha afección clínica, en donde la afección clínica se caracteriza por al menos un fenotipo celular, y en donde cada miembro de la biblioteca es un compuesto o una combinación de compuestos, dicho método comprende las etapas de:

- i) proporcionar una muestra que comprende células asociadas con dicha afección clínica a partir de un individuo que padece de dicha afección clínica,
- ii) determinar si dichos miembros de la biblioteca modifican dicho fenotipo celular mediante el empleo de uno de los métodos para identificar un compuesto o una combinación de compuestos según la invención, en donde la modificación del fenotipo celular mediante los miembros de la biblioteca es indicativo de la eficacia del tratamiento de la afección clínica en dicho individuo.

Es también un aspecto de la invención proporcionar un compuesto o una combinación de compuestos para el tratamiento de una afección clínica en un individuo que necesita del mismo, en donde la condición clínica se asocia con al menos un fenotipo celular, y en donde el individuo comprende células asociadas con la afección clínica, en la que dicho compuesto o combinación de compuestos son capaces de modificar dicho fenotipo celular, en donde el compuesto o combinación de compuestos se han identificado empleando uno de los métodos para identificar un compuesto o una combinación de compuestos según la invención.

Es también un aspecto de la invención proporcionar un kit de piezas que comprenden una matriz según la invención e información para realizar los métodos para identificar un compuesto o una combinación de compuestos según la invención.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el crecimiento de un micro-tumor en pocillos con una elevada dosis de doxorrubicina (par de barras de la izquierda), pocillos control sin pocillos cercanos con doxorrubicina (par de barras central) y pocillos control con elevada dosis de doxorrubicina cercana (par de barras de la derecha). No se observa un derramamiento entre los pocillos.

La Figura 2 muestra un cribado de quimio-sensibilidad. A) muestra un cribado de quimio-sensibilidad en micro-tumores a partir de dos pacientes diferentes; se ensaya la inhibición del crecimiento mediante un grupo de quimio-terapias estándar en concentraciones crecientes. En el paciente 1 la proliferación de células cancerosas se inhibe mediante 5FU y SN38, pero no mediante Oxaliplatino, Leucovorina y Cetuximab. En el paciente 2 la proliferación de células cancerosas se inhibe mediante 5FU, SN38 y Oxaliplatino, pero no mediante Leucovorina y Cetuximab. B) muestra un cribado de quimio-sensibilidad en esferoides de células cancerosas a partir de tres pacientes de cáncer diferentes (panel superior: paciente con baja sensibilidad a fármacos ensayados; panel central: paciente con moderada sensibilidad a los fármacos ensayados; panel inferior: paciente con alta sensibilidad a los fármacos ensayados). C) muestra el escáner CT del paciente que muestra sensibilidad moderada después del tratamiento con compuestos pronosticados por ser eficaces.

La Figura 3 muestra el trazado en el tiempo del crecimiento del micro-tumor en presencia y ausencia del compuesto quimio-terapéutico Irinotecán.

La Figura 4 muestra el crecimiento del micro-tumor bajo la exposición a Irinotecán (SN38) durante 10 días en un soporte de fase cambiante.

15 Definiciones

El término “un” como se emplea en la presente memoria, puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se emplee.

El término “miembro de biblioteca” como se emplea en la presente memoria se refiere bien a un compuesto o bien a una combinación de más de un compuesto. Por tanto, cada miembro de biblioteca puede ser un compuesto o una combinación específica de compuestos.

El término “célula viva” se emplea para indicar una célula que se considera viva según el criterio estándar para ese tipo de célula particular. En general una célula se considera que está viva, cuando se mantiene el potencial de membrana normal, se mantienen la integridad de la membrana celular y/o se mantiene el metabolismo energético normal.

El término “sol-gel” como se emplea en la presente memoria se refiere a un soporte, que puede cambiar de manera reversible entre un “estado sol” y un “estado gel”. Se puede determinar si un soporte está en el “estado sol” o el “estado gel” mediante la colocación del soporte en un tubo de ensayo convencional. Cuando el tubo de ensayo se pone boca abajo, en el caso donde la interfaz (menisco) entre el soporte y el aire se deforma (incluyendo un caso en donde la disolución fluye hacia fuera del tubo de ensayo) debido al peso de la disolución en sí misma, el soporte se define como que está en el “estado sol”. Por otro lado, en el caso donde la interfaz (menisco) entre la disolución y el aire no se deforma debido al peso de la disolución en sí misma, incluso cuando el tubo se pone boca abajo, el soporte anterior se define como que está en “estado gel”.

El término “fármaco aprobado” como se emplea en la presente memoria describe un compuesto o una combinación de compuestos que se han aprobado por al menos una autoridad nacional para el empleo en el tratamiento de seres humanos y/o animales.

El término “que comprende” se debe entender de una manera inclusiva. Por lo tanto, a modo de ejemplo, una composición que comprende un compuesto X, puede comprender un compuesto X y opcionalmente compuestos adicionales.

El término “pluralidad” se debe entender como “al menos dos”.

El término “biblioteca” se debe entender como una colección de miembros de biblioteca que comprenden al menos 2 miembros de biblioteca diferentes.

El término “moléculas o compuestos orgánicos pequeños” se refiere en la presente memoria a compuestos que contienen un carbono no oligomérico, producibles mediante síntesis química, y que tienen normalmente un tamaño de menos de 600 unidades de masa.

El término “esferoide” como se emplea en la presente memoria se refiere a una pluralidad de células unidas unas a las otras. Preferiblemente, un esferoide comprende al menos 10 células, tal como al menos 50 células, por ejemplo al menos 100 células unidas unas a otras. Frecuentemente, el esferoide tiene esencialmente forma de esfera; sin embargo, los esferoides pueden adoptar también otras formas 3D.

El término “tratamiento” como se emplea en la presente memoria se puede referir al tratamiento curativo o paliativo.

50 Descripción detallada de la invención

Método de identificación de un compuesto

En un aspecto la presente invención se refiere a métodos para identificar un compuesto o una combinación de

compuestos que modifican al menos un fenotipo celular. En general los métodos comprenden incubar una pluralidad de miembros de biblioteca con células, seguido de la detección de si el miembro de biblioteca modifica el fenotipo celular.

En general los métodos comprenden las etapas de:

- 5 i) proporcionar una matriz, que puede ser cualquiera de las matrices descritas en la presente memoria más abajo en la sección "Matriz"; y
- ii) proporcionar una suspensión de células que puede adquirir dicho fenotipo celular, en donde dichas células pueden ser cualquiera de las células descritas en la presente memoria más abajo en la sección "Células";
- iii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células; y
- 10 iv) llevar el soporte al estado sol en donde las etapas iii) y iv) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden, permitiendo de este modo que las células fluyan en el soporte; y
- v) llevar el soporte al estado de gel atrapando de este modo a las células en el soporte; y
- vi) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el mantenimiento y/o crecimiento de las células
- vii) detectar el fenotipo celular en las células; identificando de este modo un compuesto o una combinación de
- 15 compuestos que modifican dicho fenotipo celular.

Por tanto, en una realización las etapas iii) y iv) se realizan en el siguiente orden:

- iii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células, mientras el soporte está en estado de gel; y
- iv) llevar el soporte al estado sol.

- 20 El fenotipo celular puede estar en cualquiera de los fenotipos celulares descritos en la presente memoria más abajo en la sección "Fenotipo celular". En realizaciones preferidas de la invención, el fenotipo celular se puede detectar directamente mediante inspección visual, por ejemplo, mediante inspección visual empleando un microscopio. Tales fenotipos celulares pueden ser, por ejemplo, la proliferación celular o la muerte celular. Como se describe en más detalle a continuación, las células se pueden proporcionar en la forma de esferoides, y el fenotipo celular puede ser
- 25 el crecimiento de dichos esferoides. Tal crecimiento se puede visualizar directamente mediante inspección visual.

Por tanto, en una realización la invención proporciona métodos para identificar compuestos o una combinación de compuestos capaces de inhibir la proliferación y/o el crecimiento de células, dichos métodos comprenden las etapas de:

- 30 v) proporcionar una matriz, que puede ser cualquiera de las matrices descritas en la presente memoria más abajo en la sección "Matriz"; y
- vi) proporcionar células, que pueden estar en forma de esferoides;
- vii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con las células; y
- viii) llevar el soporte al estado sol en donde las etapas iii) y iv) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden, permitiendo de este modo que las células fluyan en el soporte; y
- 35 ix) llevar el soporte al estado de gel atrapando de este modo a las células en el soporte; y
- x) incubar la matriz bajo condiciones que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de las células;
- xi) detectar la proliferación de células y/o el crecimiento de los esferoides.

En una realización las etapas iii) y iv) se realizan en el siguiente orden:

- 40 iii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células, mientras el soporte está en estado de gel; y
- iv) llevar el soporte al estado sol.

Como se explica a continuación en la presente memoria la matriz comprende una pluralidad de espacios, en donde varios espacios comprenden diferentes miembros de biblioteca. Dichos miembros de biblioteca pueden ser cualquiera de los miembros de biblioteca descritos en la sección "Biblioteca" a continuación en la presente memoria.

- 45 En una realización la invención proporciona métodos para identificar compuestos o una combinación de compuestos

capaces de inhibir la proliferación y/o el crecimiento de células, dichos métodos comprenden las etapas de:

- 5 i) proporcionar una matriz, que puede ser cualquiera de las matrices descritas en la presente memoria más abajo en la sección "Matriz", en donde la matriz comprende un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar entre un estado sol a un estado de gel en la temperatura de transición sol-gel; y
- ii) proporcionar células que pueden estar en forma de esferoides; y
- iii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con las células; y
- 10 iv) llevar el soporte al estado sol mediante incubación a una temperatura por debajo de la temperatura de transición sol-gel; en donde las etapas iii) y iv) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden, permitiendo de este modo que las células fluyan en el soporte; y
- v) llevar el soporte al estado de gel mediante incubación a una temperatura por encima de la temperatura de transición sol-gel, atrapando de este modo a las células en el soporte; y
- vi) incubar la matriz bajo condiciones que permiten el crecimiento de las células;
- vii) detectar la proliferación de células y/o el crecimiento de los esferoides.

15 Como se explica a continuación en la presente memoria la matriz comprende una pluralidad de espacios, en donde varios espacios comprenden diferentes miembros de biblioteca. Dichos miembros de biblioteca pueden ser cualquiera de los miembros de biblioteca descritos en la sección "Biblioteca" a continuación en la presente memoria.

Biblioteca

20 Los métodos de la presente invención implican una etapa para proporcionar una biblioteca de miembros de biblioteca o proporcionar una matriz que comprende miembros de biblioteca. La invención se refiere también a matrices que comprenden miembros de biblioteca útiles para los métodos de la invención.

La biblioteca es una colección de miembros de biblioteca. Cada miembro de biblioteca es un compuesto o una combinación específica de compuestos.

25 La biblioteca o la matriz puede comprender preferiblemente al menos 10, tal como al menos 20, por ejemplo, al menos 40, tal como al menos 50, por ejemplo, al menos 60, tal como al menos 70, por ejemplo, al menos 80, por ejemplo, al menos 90, miembros de biblioteca diferentes. Por tanto, se pueden proporcionar y usar con los métodos de la invención al menos 10, tal como al menos 20, por ejemplo, al menos 40, tal como al menos 50, por ejemplo, al menos 60, tal como al menos 70, por ejemplo, al menos 80, por ejemplo, al menos 90 miembros de biblioteca. Por ejemplo, con los métodos de la invención se pueden emplear en el intervalo de 10 a 100, tal como en el intervalo de 20 a 100, por ejemplo, en el intervalo de 40 a 100, tal como en el intervalo de 50 a 100, por ejemplo, en el intervalo de 60 a 100, tal como en el intervalo de 70 a 100, por ejemplo, en el intervalo de 10 a 80, tal como en el intervalo de 20 a 80, por ejemplo, en el intervalo de 40 a 80, tal como en el intervalo de 50 a 80, por ejemplo, en el intervalo de 10 a 50, tal como en el intervalo de 20 a 50 miembros de biblioteca diferentes.

35 Las matrices que se emplean con la presente invención comprenden una pluralidad de espacios, que pueden comprender diferentes miembros de biblioteca. Por ejemplo, cada espacio puede comprender un miembro de biblioteca diferente. La invención también comprende que varios espacios de una matriz pueden comprender al mismo miembro de biblioteca, por ejemplo, varios espacios de una matriz pueden comprender el mismo miembro de biblioteca en diferente concentración. Por tanto, una matriz puede comprender el mismo miembro de biblioteca en el intervalo de 1 a 20, tal como en el intervalo de 1 a 15, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 10, tal como en el intervalo de 1 a 5 concentraciones diferentes. La invención también comprende que varios espacios de la matriz pueden comprender el mismo miembro de biblioteca en la misma concentración.

Como se menciona anteriormente cada miembro de biblioteca puede ser un compuesto o una combinación de compuestos. Dichos compuestos pueden, por ejemplo, ser moléculas orgánicas pequeñas, compuestos que contienen carbono no oligomérico, u oligómeros.

45 Los oligómeros pueden ser, por ejemplo, péptidos, glicopéptidos, lipopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN), oligosacáridos, o proteínas.

En determinadas realizaciones de la presente invención la biblioteca comprende o incluso consiste en miembros de biblioteca que comprenden fármacos útiles para el tratamiento de una afección clínica. Por tanto, el miembro de biblioteca puede ser un fármaco o una combinación de fármacos útiles para el tratamiento de una afección clínica.

50 En particular, en realizaciones de la invención, en donde las células son células asociadas a una afección clínica, entonces la biblioteca puede comprender o incluso consistir en miembros de biblioteca que comprenden un fármaco o fármacos útiles para el tratamiento de dicha afección clínica. Por ejemplo, en realizaciones de la invención en donde las células son células cancerosas, por ejemplo, las células son células cancerosas primarias, entonces la

biblioteca puede comprender o consistir en miembros de biblioteca que comprenden un fármaco o fármacos útiles para el tratamiento del cáncer. Por tanto, dichos miembros de biblioteca puede ser un fármaco o una combinación de fármacos útiles para el tratamiento del cáncer.

5 Fármacos útiles para el tratamiento del cáncer incluyen a compuestos de quimioterapia, compuestos citotóxicos, compuestos sensibilizantes, anticuerpos dirigidos específicamente a células cancerosas, inhibidores de la angiogénesis, compuestos que modulan el sistema inmunológico u hormonas para terapia hormonal. Los compuestos citotóxicos son compuestos tóxicos para al menos un tipo de células. Muchos fármacos convencionales para el tratamiento del cáncer son compuestos citotóxicos. Los compuestos sensibilizantes son compuestos, que pueden hacer sensibles las células cancerosas a otro tratamiento, por ejemplo, la radiación. Por tanto, los compuestos sensibilizantes pueden ser compuestos, que solos no tienen efecto sobre el cáncer, pero que en combinación con otro tratamiento pueden mejorar el efecto de dicho tratamiento.

Dicho fármaco útil para el tratamiento de una afección clínica puede ser un fármaco aprobado. Ejemplos no limitantes de fármacos útiles para el tratamiento del cáncer se describen en <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/alphalist>. Por tanto, el fármaco útil para el tratamiento del cáncer se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en los fármacos aprobados consiguientes. Por tanto, la biblioteca puede comprender uno o más miembros de biblioteca que comprenden uno o más fármacos útiles para el tratamiento del cáncer seleccionados del grupo que consiste en Acetato de Abiratonina, Abitrexate (Metotrexato), Abraxane (Paclitaxel Albúmina-Formulación de Nanopartículas estabilizadas), ABVD, ABVE, ABVE-PC, AC, AC-T, Adcetris (Brentuximab Vedotin), ADE, Ado-Trastuzumab Emtansina, Adriamicina (Clorhidrato de Doxorubicina), Aducril (Fluorouracilo), Dimaleato de Afatinib, Afinitor (Everolimus), Aldara (Imiquimod), Aldesleukina, Alemtuzumab, Alimta (Pemetrexed Disódico), Aloxi (Clorhidrato de Palonosetron), Ambochlorin (Clorambucilo), Amboclorin (Clorambucilo), Ácido aminolevulínico, Anastrozol, Aprepitant, Aredia (Pamidronato Disódico), Arimidex (Anastrozol), Aromasin (Exemestano), Arranon (Nelarabina), Trióxido de Arsénico, Arzerra (Ofatumumab), Asparaginasa de Erwinia chrysantemi, Avastin (Bevacizumab), Axitinib, Azacitidina, BEACOPP, Clorhidrato de Bendamustina, BEP, Bevacizumab, Bexaroteno, Bexxar (Tositumomab y Tositumomab con yodo 131), Bicatulamida, Bleomicina, Bortezomib, Bosulif (Bosutinib), Bosutinib, Brentuximab Vedotin, Busulfán, Busulfex (Busulfán), Cabazitaxel, S-Malato de Cabozantinib, CAF, Campath (Alemtuzumab), Camptosar (Clorhidrato de Irinotecán), Capecitabina, CAPOX, Carboplatino, CARBOPLATINO-TAXOL, Carfilzomib, Casodex (Bicatulamida), CeeNU (Lomustina), Ceritinib, Cerubidina, (Clorhidrato de Daunorrubicina), Cervarix (Vacuna Bivalente HPV Recombinante), Cetuximab, Clorambucilo, CLORAMBUCILO-PREDNISONA, CHOP, Cisplatino, Clafen (Ciclofosfamida), Clofarabina, Clofarex (Clofarabina), Clolar (Clofarabina), CMF, Cometriq (S-Malato de Cabozantinib), COPP, COPP-ABV, Cosmegen (Dactinomicina), Crizotinib, CVP, Ciclofosfamida, Cyfos (Ifosfamida), Cyramza (Ramucirumab), Citarabina, Citarabina Liposomal, Cytosar-U (Citarabina), Cytoxan (Ciclofosfamida), Dabrafenib, Dacarbazina, Dacogen (Decitabina), Dactinomicina, Dasatinib, Clorhidrato de Daunorrubicina, Decitabina, Degarelix, Denileukina Diftitox, Denosumab, depoCyt (Citarabina Liposomal), depoFoam (Citarabina Liposomal), Clorhidrato de Dexrazoxano, Docetaxel, Doxil (Liposoma de Clorhidrato de Doxorubicina), Clorhidrato de Doxorubicina, Liposoma de Clorhidrato de Doxorubicina, Dox-SL (Liposoma de Clorhidrato de Doxorubicina), DTIC-Dome (Dacarbazina), Efudex (Fluorouracilo), Elitek (Rasburicasa), Ellence (Clorhidrato de Epirubicina), Eloxatin (Oxaliplatino), Eltrombopag Olamina, Emend (Aprepitant), Enzalutamida, Clorhidrato de Epirubicina, EPOCH, Erbitux (Cetuximab), Mesilato de Eribulina, Erivedge (Vismodegib), Clorhidrato de Erlotinib, Erwinaze (Asparaginasa de Erwinia chrysantemi), Etopophos (Fosfato de Etopósido), Etopósido, Fosfato de Etopósido, Evacet (Liposoma de Clorhidrato de Doxorubicina), Everolimus, Evista (Clorhidrato de Raloxifeno), Exemestano, Fareston (Toremifeno), Faslodex (Fulvestrant), FEC, Femara (Letrozol), Filgrastim, Fludara (Fosfato de Fludarabina), Fosfato de Fludarabina, Fluoroplex (Fluoruracilo), Fluoruracilo, Folex (Metotrexato), Folex PFS (Metotrexato), FOLFIRI, FOLFIRI-BEVACIZUMAB, FOLFIRI-CETUXIMAB, FOLFIRINOX, FOLFOX, Folutyn (Pralatrexato), FU-LV, Fulvestrant, Gardasil (Vacuna Tetravalente HPV Recombinante), Gazyva (Obinutuzumab), Gefitinib, Clorhidrato de Gemcitabina, GEMCITABINA-CISPLATINO, GEMCITABINA-OXALIPLATINO, Gemtuzumab Ozogamicina, Gemzar (Clorhidrato de Gemcitabina), Gilotrif (Dimaleato de Afatinib), Gleevec (Mesilato de Imatinib), Glucarpidasa, acetato de Goserelina, Halaven (Mesilato de Eribulina), Herceptin (Trastuzumab), Vacuna Bivalente HPV Recombinante, Vacuna Tetravalente HPV Recombinante, Hycamtin (Clorhidrato de Topotecán), Hiper-CVDA, Ibritumomab Tiuxetan, Ibrutinib, ICE, Iclusig (Clorhidrato de Ponatinib), Ifex (Ifosfamida), Ifosfamida, Ifosfamidum (Ifosfamida), Mesilato de Imatinib, Imburvica (Ibrutinib), ImiquimodNyta (Axitinib), Intron A (Interferón Recombinante Alfa-2b), Tositumomab y Tositumomab con yodo 131, Ipilimumab, Iressa (Gefitinib), Clorhidrato de Irinotecán, Istodax (Romidepsina), Ixabepilona, Ixempra (Ixabepilona), Jakafi (Fosfato de Ruxolitinib), Jevtana (Cabazitaxel), Kadcyla (Ado-Trastuzumab Emtasina), Keoxifene (Clorhidrato de Raloxifeno), Kepivance (Palifermin), Kyprolis (Carfilzomib), Ditosilato de Lapatinib, Lenalidomina, Letrozol, Leucovorina Cálcica, Leukeran (Clorambucilo), Acetato de Leuprolida, Levulan (Ácido aminolevulínico), Linfozilin (Clorambucilo), LipoDox (Liposoma de Clorhidrato de Doxorubicina), Citarabina liposomal, Lomustina, Lupron (Acetato de Leuprolida), Lupron Depot (Acetato de Leuprolida), Lupron Depot-Ped (Acetato de Leuprolida), Lupron Depot-3 Meses (Acetato de Leuprolida), Lupron depot-4 meses (Acetato de Leuprolida), Marqibo (Liposoma de Sulfato de Vincristina), Matulane (Clorhidrato de Procarbazona), Clorhidrato de Mecloretamina, Megace (Acetato de Megestrol), Acetato de Megestrol. Mekinist (Trametinib), Mercaptopurina, Mesna, Mesnex (Mesna), Methazolastone (Temozolomida), Metotrexato, Metotrexato LPF (Metotrexato), Mexate (Metotrexato), Mexate-AQ (Metotrexato), Mitomicina C, Mitozytrex (Mitomicina C), MOPP, Mozobil (Plerixafor), Mustargen (Clorhidrato de Mecloretamina), Mutamycin (Mitomicina C), Myleran (Busulfán),

Mylosar (Azacitidina), Mylotarg (Gentuzumab Ozogamicina), Nanoparticle Paclitaxel (Paclitaxel Albúmina-
 Formulaci3n de Nanopartículas estabilizadas), Navelbine (Tartrato de Vinorelbina), Nelarabine, Neosar
 (Cicofosfamida), Neupogen (Filgrastim), Nexavar (Tosilato de Sorafenib), Nilotinib, Nolvadex (Citrato de
 5 Tamoxifeno), Nplate (Romiplostim), Obinutuzumab, Ofatumumab, Mepesuccinato de Omacetaxina, Oncaspar
 (Pegaspargasa), Ontak (Denileukina Diftitox), OEPA, OFF, OPPA, Oxaliplatino, Paclitaxel, Paclitaxel Albúmina-
 Formulaci3n de Nanopartículas estabilizadas, PAD, Palifermin, Clorhidrato de Palonosetr3n, Pamidronato Dis3dico,
 Panitumumab, Paraplat (Carboplatino), Paraplatin (Carboplatino), Clorhidrato de Pazopanib, Pegaspargasa,
 Peginterfer3n Alfa-2b, PEG-Intr3n (Peginterfer3n Alfa-2b), Pemetrexed Dis3dico, Perjeta (Pertuzumab), Pertuzumab,
 10 Platinol (Cisplatino), Platinol-AQ (Cisplatino), Plerixafor, Pomalidomida, Pomalyst (Pomalidomida), Clorhidrato de
 Ponatinib, Pralatrexato, Prednisona, Clorhidrato de Procarbazona, Proleukin (Aldesleukina), Prolia (Denosumab),
 Promacta (Eltrombopag Olamina), Provenge (Sipuleucel-T), Purinethol (Mercaptopurina), Purixan (Mercaptopurina),
 Dicloruro de Radio 223, Clorhidrato de Raloxifeno, Ramucirumab, Rasburicase, R-CHOP, R-CVP, Vacuna Bivalente
 HPV Recombinante, Vacuna Tetraivalente HPV Recombinante, Interfer3n Alfa-2b Recombinante, Regorafenib,
 15 Revlimid (Lenalidomida), Rheumatex (Metotrexato), Ritusan (Rituximab), Rituximab, Romidepsina, Romiplostim,
 Rubidomicina (Clorhidrato de Daunorrubicina), Fosfato de Ruxolitinib, Aerosol Intrapleurar de Sclerosol (Talco),
 Siltuximab, Sipuleucel-T, Tosilato de Sorafenib, Sprycel (Dasatinib), STANFORD V, Polvo de Talco Est3ril (Talco),
 Steritalc (Talco), Stivarga (Regorafenib), Malato de Sunitinib, Sutent (Malato de Sunitinib), Sylatron (Peginterfer3n
 Alfa-2b), Sylvant (Siltuximab), Synovir (Talidomida), Synribo (Mepesuccinato de Omacetaxina), TAC, Tafinlar
 (Dabrafenib), Citrato de Tamoxifeno, Tarabine PFS (Citarabina), Tarceva (Clorhidrato de erlotinib), Targretin
 20 (Bexaroteno), Tassigna (Nilotinib), Taxol (Paclitaxel), Taxotere (Docetaxel), Temodar (Temozolomida),
 Temozolomida, Temsirolimus, Talidomida, Thalomid (Talidomida), Toposar (Etop3sido), Clorhidrato de Topotec3n,
 Toremifeno, Torisel (Temsirrolimus), Tositumomab y Tositumomab con yodo 131, Totecl (Clorhidrato de
 Dexrazoxano), Trametinib, Trastuzumab, Treanda (Clorhidrato de Bendamustina), Trisenox (Tri3xido de Ars3nico),
 Tykerb (Ditosilato de Lapatinib), Vandetanib, VAMP, Vectibix (Panitumumab), VelP, Velban (Sulfato de Vinblastina),
 25 Velcade (Bortezomib), Velsar (Sulfato de Vinblastina), Vemurafenib, VePesid (Etop3sido), Viadur (Acetato de
 Leuprolida), Vidaza (Azacitidina), Sulfato de Vinblastina, Vincasar PFS (Sulfato de Vincristina), Sulfato de Vincristina,
 Liposoma de Sulfato de Vincristina, Tartrato de Vinorelbina, Vismodegib, Voraxaze (Glucarpidasa), Vorinostat,
 Votrient (Clorhidrato de Pazopanib), Wellcovorin (Leucovorina C3lcica), Xalkori (Crizotinib), Xeloda (Capecitabina),
 XELOX, Xgeva (Denosumab), Xofigo (Dicloruro de Radio 223), Xtandi (Enzalutamida), Yervoy (Ipilimumab), Zaltrap
 30 (Ziv-Aflibercept), Zelboraf (Vemurafenib), Zevalin (Ibritumomab Tiuxet3n), Zinecard (Clorhidrato de Dexrazoxano),
 Ziv-Aflibercept, Zoladex (Acetato de Goserelina), 3cido Zoledr3nico, Zolinza (Vorinostat), Zometa (3cido
 Zoledr3nico), Zykadia (Ceritinib), y Zytiga (Acetato de Abiraterona).

La biblioteca puede ser tambi3n una biblioteca combinatoria. Ejemplos no limitantes de bibliotecas combinatorias
 que se pueden emplear con la presente invenci3n y m3todos de producci3n se proporcionan en bibliotecas
 35 combinatorias tales como: Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis: 1998 Roland E. Dolle y
 Kingsley H. Nelson, Jr. J. Comb. Chem., 1999, pp 235-282; Comprehensive Survey of Combinatorial Library
 Synthesis: 1998 Roland E. Dolle J. Comb. Chem., 2000, pp 383-433; Comprehensive Survey of Combinatorial
 Library Synthesis: 2000 Roland E. Dolle J. Comb. Chem., 2001, pp 477-517; Comprehensive Survey of
 Combinatorial Library Synthesis: 2001 Roland E. Dolle J. Comb. Chem., 2002, pp 369-418 y Comprehensive Survey
 40 of Combinatorial Library Synthesis: 2002 Roland E. Dolle J. Comb. Chem., 2003, pp 693-753. El experto en la
 t3cnica apreciar3 que estos protocolos pueden adaptarse f3cilmente a necesidades especifcas de una realizaci3n
 particular de la presente invenci3n.

En una realizaci3n, la biblioteca puede comprender miembros de biblioteca que comprenden o consisten en
 45 olig3meros naturales (componentes de olig3meros que aparecen en la Naturaleza) tal como p3ptidos, glicop3ptidos,
 lipop3ptidos, 3cidos nucleicos (ADN o ARN), u oligosac3ridos. A modo de ejemplo, un olig3mero natural puede ser
 cualquier p3ptido que consiste en un amino3cido que aparece de manera natural, incluso si dicho p3ptido
 comprende una secuencia que no se presenta en la naturaleza. Las bibliotecas pueden comprender tambi3n
 pol3meros, tal como polip3ptidos, o prote3nas, por ejemplo, la biblioteca puede comprender anticuerpos. Las
 50 bibliotecas pueden comprender diferentes olig3meros naturales o las bibliotecas pueden comprender s3lo un tipo de
 olig3mero natural, por ejemplo, la biblioteca puede ser una biblioteca peptidica. En otra realizaci3n, pueden ser
 olig3meros no naturales (olig3meros que comprenden uno o m3s componentes que no aparecen en la Naturaleza)
 tal como p3ptidos modificados qu3micamente, glicop3ptidos, 3cidos nucleicos (ADN o ARN), o, oligosac3ridos, y
 similares. Dicha modificaci3n qu3mica puede ser, por ejemplo, el empleo de componentes no naturales conectados
 55 mediante el enlace natural uniendo las unidades (por ejemplo, un enlace de amidop3ptido), el empleo de
 componentes naturales con unidades de uni3n modificadas (por ejemplo, oligoureas como se discute en Boeijen et
 al., 2001, J. Org. Chem., 66:8454-8462; oligosulfonamidas como se discute en Monnee et al., 2000, Tetrahedron
 Lett., 41:7991-95), o combinaciones de estos (por ejemplo, amidas de estatinas como se discute en Dolle et al.,
 2000, J. Comb. Chem., 2:716-31). Olig3meros no naturales pueden comprender una mezcla de componentes no
 60 naturales que aparecen de manera natural unidos unos a otros mediante enlaces que aparecen de manera natural.
 A modo de ejemplo, el olig3mero puede comprender amino3cidos que aparecen de manera natural y componentes
 no naturales unidos mediante enlaces peptidicos, por ejemplo, PNA o LNA. Por tanto, en una realizaci3n de la
 invenci3n olig3meros preferidos comprenden amino3cidos o amino3cidos modificados (mim3ticos). Otros olig3meros
 no naturales preferidos incluyen, por ejemplo, oligoureas, poliazatidas, olig3meros con enlaces C-C arom3ticos y
 olig3meros con enlaces C-N arom3ticos. Otros olig3meros preferidos comprenden una mezcla de componentes

naturales y no naturales y enlaces de unión naturales y no naturales. Por ejemplo, el oligómero no natural puede ser cualquiera de los oligómeros mencionados en revisiones recientes, véase: Graven et al., *J. Comb. Chem.*, 3:441-52; St. Hilaire et al., 2000, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 39:1162-79; James, 2001, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1:540-6; Marcaurrelle et al., 2002, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6:289-96; Breinbauer et al., 2002, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 41:2879-90. Las bibliotecas de la invención pueden comprender también oligómeros cíclicos.

En otra realización, las entidades moleculares pueden comprender moléculas no oligoméricas, tal como peptidomiméticos u otras moléculas orgánicas pequeñas. Los peptidomiméticos son compuestos que mimetizan la acción de un mensajero peptídico, tal como peptidomiméticos bicíclicos de tiazolidina lactama de L-propil-L-leucilglicinamida (Khalil et al., 1999, *J. Med. Chem.*, 42:2977-87). En una realización preferida de la invención, la biblioteca comprende o incluso más preferiblemente, consiste en moléculas orgánicas pequeñas. Las moléculas orgánicas pequeñas son compuestos no oligoméricos de menos de aproximadamente 600 unidades de masa que contienen cualquier variedad posible de grupos funcionales, y son el producto de una síntesis química, o se aíslan a partir de la naturaleza, o se aíslan a partir de la naturaleza y después se modifican químicamente. Los compuestos orgánicos pequeños se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ariloxilo, aciloxilo, tiol, alquiltio, ariltio, heteroariltio, sulfonilo, sulfoxilo, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcoxycarbonilamino, amidas, alquilo, alquilo ramificado, arilo, heteroarilo, nitro, ciano, halógeno, sililoxilo, cetona, heterociclos, sistemas de anillo fusionado, heterociclos fusionados y mezclas de los mismos, en donde cada uno de los grupos anteriormente mencionados se puede sustituir independientemente en cada posición con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en -H, -OH, -SH, halógeno, carboxilo, carbonilo, alcoxilo, ariloxilo, aciloxilo, alquiltio, ariltio, heteroariltio, sulfonilo, sulfoxilo, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcoxycarbonilamino, amidas, alquilo, alquilo ramificado, arilo, heteroarilo, nitro, ciano, halógeno, sililoxilo, cetona, heterociclos, sistemas de anillo fusionado, y heterociclos fusionados.

Ejemplos no limitantes de bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas que se pueden usar con la presente invención y métodos para producirlos se pueden encontrar, por ejemplo, en las revisiones de Thompson et al., 1996, *Chem. Rev.*, 96:555-600; Al-Obeidi et al., 1998, *Mol. Biotechnol.*, 9:205-23; Nefzi et al., 2001, *Biopolymers*, 60:212-9; Dolle, 2002, *J. Comb. Chem.*, 4:369-418.

Los miembros de biblioteca se pueden añadir a los espacios de la matriz en su forma libre. Sin embargo, la invención también comprende que los miembros de biblioteca se pueden unir o asociar con otros componentes, cuando se añaden a los espacios de la matriz. Por ejemplo, los miembros de biblioteca se pueden unir o asociar con partículas, tales como a nano-partículas. En una realización los miembros de biblioteca se encapsulan en partículas, por ejemplo, encapsulados en nano-partículas.

Células

Los métodos de la presente invención implican ensayar compuestos para modificar un fenotipo celular. Con este fin, las células tienen dicho fenotipo o las células están provistas para poder adquirir dicho fenotipo.

En realizaciones preferidas de la invención las células son células mamíferas. Por ejemplo, las células pueden ser células humanas.

El término "célula mamífera" está destinada a indicar cualquier célula de origen de mamífero. La células puede ser una línea celular establecida, muchas de las cuales están disponibles en la Colección de Cultivo de Tipo Americano (ATCC, Virginia, EE.UU) o una célula primaria con una vida útil limitada derivada de un tejido de mamífero, incluyendo a tejidos derivados de un animal transgénico. Las células mamíferas pueden ser también líneas celulares inmortales nuevamente establecidas derivadas de un tejido de mamífero incluyendo tejidos transgénicos, o una línea híbrida o una línea celular derivada por la fusión de diferentes tipos celulares de origen mamífero, por ejemplo, líneas celulares de hibridoma. Las células pueden expresar opcionalmente uno o más productos genéticos no nativos, por ejemplo, receptores. El término "línea celular" se destina a cubrir un grupo de células, en donde las células de ese grupo son esencialmente indistinguibles genéticamente las unas de las otras. Las células de una línea celular son, por tanto, de la misma progenie o la misma célula.

Las células pueden ser capaces de crecer en suspensión o pueden ser células adherentes. En una realización de la invención las células se han modificado genéticamente o de otra manera para mejorar su utilidad con la presente invención. La modificación puede ser estable o sólo transitoria o una mezcla de ambos. Por ejemplo, las células se pueden haber modificado para que contengan uno o más sistemas reporteros, útiles para detectar el fenotipo celular.

En una realización preferida de la invención las células son células primarias. Las células primarias son células con una vida útil limitada que se derivan preferiblemente de un tejido de mamífero. El tejido de mamífero puede ser, por ejemplo, un tejido humano, tal como un tejido sano o enfermo. Por tanto, las células pueden ser células extirpadas de un ser humano.

En realizaciones de la invención en donde las células son células primarias humanas o animales, se prefiere que los métodos de la invención se realicen en un tiempo relativamente corto después de que las células se hayan obtenido a partir de dicho ser humano o animal. Preferiblemente los métodos se realizan dentro de las 2 semanas, tal como dentro de una semana después de obtener las células a partir de dicho ser humano o animal.

En una realización las células se derivan de un tejido neoplásico, por ejemplo, un tejido neoplásico extirpado de un paciente mediante cirugía o un tejido neoplLa proliferación de células cancerosas se puede determinar también mediante la determinación del crecimiento de un esferoide. Como se emplea en la presente memoria el término "esferoide" designa una pluralidad de células que se unen las unas a las otras. Por ejemplo, se puede determinar la sección transversal más larga de un esferoide después de la incubación. Si la sección transversal más larga después de la incubación es menor que la sección transversal más larga esperada para el tipo celular particular después del tiempo de incubación dado, entonces el miembro de biblioteca es capaz de inhibir la proliferación celular. Alternativamente, se puede determinar el área de la sección transversal más larga de un esferoide después de la incubación. Si el área de la sección transversal más larga después de la incubación es menor que el área de la sección transversal más larga esperada para el tipo celular particular después del tiempo de incubación dado, entonces el miembro de biblioteca es capaz de inhibir la proliferación celular. Por tanto, si la sección transversal más larga o el área de la sección transversal más larga de un esferoide después de la incubación es como máximo del 70%, tal como máximo 60%, por ejemplo, como máximo 50%, tal como máximo 40%, por ejemplo, como máximo 30%, tal como máximo 20%, por ejemplo, como máximo 5% de la sección transversal más larga esperada para el tipo celular particular después de un tiempo de incubación dado, entonces el miembro de biblioteca es capaz de inhibir la proliferación celular. La sección transversal más larga esperada o el área de la sección transversal más larga esperada se puede determinar mediante un experimento de control realizado bajo la misma condición en ausencia de ningún miembro de biblioteca. El término "sección transversal más larga" como se emplea en la presente memoria se refiere a la longitud de la sección transversal del esferoide, en donde dicha sección transversal se realiza en el momento, donde el esferoide es más grueso. Si el esferoide es completamente circular, la sección transversal más larga corresponde al diámetro.

En otra realización de la invención el fenotipo celular puede ser la inhibición de la angiogénesis. Este puede ser el caso en realizaciones que se refieren a métodos para identificar un compuesto útil para el tratamiento del cáncer. En tales realizaciones, se proporciona normalmente una mezcla de células, en donde la mezcla contiene tanto células cancerosas como células endoteliales. Las células se incuban bajo condiciones que permitan la angiogénesis en ausencia de un miembro de biblioteca, y se identifican los miembros de biblioteca que reducen o inhiben la angiogénesis.

En una realización el fenotipo celular puede estar mediado a través de la interacción entre moléculas celulares, tales como moléculas intracelulares. Las moléculas celulares pueden ser, por ejemplo, componentes de una ruta de transducción de señales, y por tanto, el fenotipo celular puede ser la activación o la represión de una ruta de transducción de señales. Tales fenotipos celulares pueden ser cualquiera de las respuestas celulares descritas en las solicitudes de patente internacional WO 2005/116643 o WO2005/116656.

Ejemplos de modulaciones de rutas de transducción de señales incluyen:

- Regulación al alza o regulación a la baja del nivel de un miembro de la ruta
- Relocalización de un miembro de la ruta
- Formación del complejo entre los miembros de la ruta o entre los miembros de la ruta con otros compuestos celulares
- Transducción mejorada o reducida de los genes regulados por la ruta
- Modificación mediante, por ejemplo, fosforilación de un miembro de la ruta
- Activación o inhibición de una enzima de la ruta
- Degradación de compuestos celulares debido a la regulación al alza o a la regulación a la baja de la ruta
- Secreción alterada de un compuesto
- Cambio en el flujo iónico
- Cambios morfológicos
- Cambio en la viabilidad

La modulación de una ruta de transducción de señales se puede controlar, por ejemplo, mediante la medición de:

- la actividad enzimática de una enzima que es parte de dicha ruta de transducción de señales
- el nivel de nucleótidos cíclicos, es decir, AMPc o GMPc
- la actividad de los factores de transcripción

- el nivel de proteínas específicas como se cuantifica a través de técnicas proteómicas estándar
 - el nivel de inositol o el de fosfatos lipídicos
 - el nivel de fosforilación de proteínas específicas como se cuantifica a través de técnicas proteómicas estándar
- 5
- la unión entre dos o más proteínas o polipéptidos
 - la localización celular de proteínas o polipéptidos

Métodos para controlar la modulación de una ruta de transducción de señales incluyen los métodos descritos en la sección "Sistema reportero" y "Salida detectable" en las solicitudes de patente internacional WO 2005/116643 o WO2005/116656.

10 Soporte

Los métodos de la invención implican el uso de soportes compatibles con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar entre un estado sol y un estado en gel. De manera similar, las matrices de la invención comprenden tal soporte.

15 El término "compatible con las células" como se emplea en la presente memoria se refiere al soporte que cuando está en contacto con los sistemas celulares no produce un efecto adverso sobre las células.

El soporte debe ser capaz preferiblemente de soportar el mantenimiento y/o el crecimiento de las células. Un soporte es capaz de soportar el mantenimiento y/o el crecimiento de las células, si las células pueden estar en contacto con dicho soporte y bien permanecer vivas y/o proliferar.

20 En particular, el soporte puede ser un soporte capaz de soportar el crecimiento de cultivos celulares 3D. Normalmente los cultivos 3D están embebidos en un polímero, por ejemplo, un hidrogel como Matrigel (BD Matrigel™), PuraMatrix™ (3D Matrix Medical Technology), alginato o gelatina que tras un cambio de temperatura puede cambiar entre un estado sol y un estado en gel sin una mayor alteración de las células embebidas.

Se prefiere que el soporte sea un gel reversible a la temperatura, es decir, un gel, que es reversible puede cambiar entre el estado sol y el estado en gel dependiente de la temperatura.

25 En particular, se prefiere que el soporte sea un sol-gel compatible con las células.

Frecuentemente, el soporte comprende uno o más polímeros. Por ejemplo, el sol-gel puede comprender o consistir en un hidrogel, por ejemplo, un hidrogel compatible con la célula. El sol-gel puede ser también una mezcla de diferentes hidrogeles.

30 Un hidrogel según la presente invención consiste normalmente en uno o más polímeros y una dispersión líquida. Dicho polímero o polímeros se refieren en la presente memoria como "polímeros en hidrogel". El polímero en hidrogel puede ser un polímero, que tiene una estructura de entrecruzamiento o una estructura de red, y tiene una propiedad tal que puede formar un hidrogel mediante retención de agua (en el interior del mismo) basándose en tal estructura. El hidrogel puede comprender también una combinación de dos o más polímeros de hidrogel diferentes. Además, el término "hidrogel" se refiere a un gel que comprende, al menos una estructura de entrecruzamiento o estructura en red que comprende un polímero de hidrogel, y una dispersión líquida soportada o retenida mediante tal estructura.

35 La "dispersión líquida" es normalmente una dispersión acuosa útil para el cultivo de células. Por tanto, la dispersión líquida puede ser un medio de cultivo celular. El medio de cultivo celular comprende los compuestos requeridos para el mantenimiento y/o el crecimiento de células, tal como nutrientes, hormonas y factores de crecimiento. El medio de cultivo debe ser compatible con el tipo celular particular empleado en los métodos de la invención. El experto en la técnica será capaz de seleccionar un medio de cultivo celular útil para un tipo celular dado. En particular, el soporte puede ser un sol-gel, que puede cambiar de manera reversible entre el "estado sol", y el "estado en gel". Diferentes factores pueden influir si el sol-gel está en el "estado sol" o en el "estado en gel". Por tanto, por ejemplo, el estado de sol-gel puede ser dependiente del pH, la temperatura o la presencia de iones específico.

40 En una realización el estado del sol-gel es dependiente del pH. Por tanto, a un pH superior a un pH dado el sol-gel puede estar en el estado de gel, mientras que un pH inferior a un pH dado el sol-gel puede estar en el estado sol. Es posible que a un pH por encima de un pH dado el sol-gel pueda estar en el estado sol, mientras que a un pH por debajo de un pH dado el sol-gel puede estar en el estado sol. Un ejemplo no limitante de tal sol-gel incluye el gel Puramatrix disponible en BD Biosciences.

50 La invención también comprende que el sol-gel puede estar en el estado sol, por encima de una determinada concentración de un compuesto, por ejemplo, por encima de una determinada concentración de un ión. Dicho ión se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en Ca^{2+} y Na^+ .

En una realización preferida de la invención el sol-gel cambia entre el estado sol y el estado en gel en base a la temperatura. Por tanto, el sol-gel, puede ser un sol-gel, que puede cambiar de manera reversible puede cambiar entre el "estado sol", y el "estado en gel" en la "temperatura de transición sol-gel".

5 El estado de una transición sol-gel se puede determinar preferiblemente como sigue. Se vierte 1 ml de un sol-gel en un estado sol en un tubo de ensayo que tiene un diámetro interior de 1cm, y se deja durante un tiempo predeterminado, por ejemplo, 12 horas. Después, cuando el tubo de ensayo se da la vuelta, en caso de que la interfaz (menisco) entre el estado sol-gel y el aire se deforme (incluyendo el caso en donde la disolución sale del tubo de ensayo) debido al peso de disolución en sí misma, el sol-gel anterior se define como un "estado sol". Por otro lado, en caso de que la interfaz (menisco) entre el sol-gel y el aire no se deforme debido al peso de la disolución en sí misma, incluso cuando el tubo de ensayo se da la vuelta, el sol-gel anterior se define como un "estado de gel".

10 El estado del sol-gel se puede determinar a temperaturas particulares, para determinar la temperatura de transición sol-gel, a diferente pH o empleando otras condiciones variables.

15 La temperatura de transición sol-gel se puede determinar realizando el método anterior mientras que se incrementa gradualmente la "temperatura predeterminada" anterior (por ejemplo, en un incremento de 1 grado C), y determinando la temperatura a la que el "estado sol" se convierte en el "estado de gel".

La determinación y medición del "estado sol", "estado gel", y "temperatura de transición sol-gel" se puede llevar a cabo como se menciona a continuación según la definición y el método descritos en una divulgación (H. Yoshioka et al., Journal of Macromolecular Science, A31(1), 113 (1994)).

20 Esto es, se determina el módulo elástico dinámico de una muestra a una frecuencia observada de 1 Hz mediante el cambio gradual de la temperatura de una temperatura baja a una temperatura alta (1 grado C/1 min). En esta medición, la temperatura de transición sol-gel se define como una temperatura en la que el almacenamiento del módulo elástico (G' , término elástico) de la muestra excede el módulo elástico de pérdidas (G'' , término viscoso). En general, el estado sol se define como un estado en el que se cumple $G'' > G'$, y el estado en gel se define como un estado en el que se cumple $G'' < G'$. Un método para medir el módulo elástico se describe, por ejemplo, en "Modern Industrial Chemistry" (Kindai kyogyo Kagaku) N° 19, editado por Ryohei Oda, et al., Página 359, publicado por Asakura Shoten, 1985).

Se prefiere que el soporte que se use con la presente invención sea un sol-gel con una temperatura de transición sol-gel en el intervalo de 0 a 35°C, tal como en el intervalo de 5 a 35°C, por ejemplo, en el intervalo de 10 a 35°C.

El sol-gel se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en geles gelatinosos y copolímeros.

30 El soporte puede ser en particular un sol-gel, y dicho sol-gel puede ser, por ejemplo, un hidrogel. El hidrogel utilizable para el soporte según la presente invención no está particularmente limitado, sin embargo el hidrogel preferiblemente muestra la transición sol-gel reversible anteriormente mencionada, tal como una transición sol-gel termo reversible (esto es, tienen preferiblemente una temperatura de transición sol-gel).

35 Ejemplos no limitantes específicos de polímeros de hidrogel incluyen, por ejemplo, copolímero en bloque de óxido de polialquileno representado por copolímeros en bloque que comprenden porciones de óxido de polipropileno y porciones de óxido de polietileno; celulosas eterificadas (o grupo que contienen éter) tal como metilcelulosa e hidroxipropilcelulosa; derivados de chitosán, por ejemplo, tal como se describe por K. R. Holme. et al. Macromolecules, 24, 3828 (1991).

40 El polímero de hidrogel puede comprender preferiblemente una combinación de bloques hidrofóbicos plurales que tienen un punto de turbidez, y un bloque hidrofílico unido a ellos. El bloque hidrofóbico puede comprender o consistir en monómeros hidrofóbicos, mientras que el bloque hidrofílico puede comprender o consistir en monómeros hidrofílicos. El punto de turbidez basado en los enlaces hidrofóbicos corresponde preferiblemente a la temperatura de transición sol-gel anteriormente mencionada del hidrogel.

45 Más específicamente, dicho polímero que tiene un punto de turbidez se puede seleccionar del grupo que consiste en: óxido de polipropileno, copolímeros que comprenden óxido de propileno y otro óxido de alquileno, derivados poli N-sustituidos de acrilamida, derivados poli N-sustituidos de metacrilamida, copolímeros que comprenden un derivado N-sustituido de acrilamida y un derivado N-sustituido de metacrilamida, polivinil metil éter, y un producto parcialmente acetilado de alcohol polivinílico.

50 Ejemplos específicos de derivados poli N-sustituidos de acrilamida y derivados poli N-sustituidos de metacrilamida incluyen, por ejemplo, Poli-N-acrilolil piperidina, Poli-N-n-propil metacrilamida, Poli-N-isopropil acrilamida, Poli-N,N-dietil acrilamida, Poli-N-isopropil metacrilamida, Poli-N-ciclopropil acrilamida, Poli-N-acrilolil pirrolidina, Poli-N,N-etil metil acrilamida, Poli-N-ciclopropil metacrilamida o Poli-N-etil acrilamida.

55 Ejemplos específicos de monómeros los hidrofílicos anteriores pueden incluir: N-vinilpirrolidona, vinilpiridina, acrilamida, metacrilamida, N-metil acrilamida, hidroxietil metacrilato, hidroxietil acrilato, hidroximetil metacrilato, hidroximetil acrilato, ácido metacrílico y ácido acrílico que tiene un grupo ácido, y sales de estos ácidos, ácido vinil

sulfónico, ácido estirenosulfónico, etc., y derivados que tienen un grupo básico, tal como metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, metacrilato de N,N-dietilaminoetilo, N,N-dimetilaminopropil acrilamida, sales de estos derivados, etc. Sin embargo, el monómero hidrofílico a usar en la presente invención no se restringe a estos ejemplos específicos.

- 5 Ejemplos específicos del monómero hidrofóbico anterior pueden incluir: derivados de acrilato y derivados de metacrilato, tal como acrilato de etilo, metacrilato de metilo, metacrilato de glicidilo; derivados N-sustituídos de alquil metacrilamida, tal como N-n-butil metacrilamida; cloruro de vinilo, acrilonitrilo, estireno, acetato de vinilo, etc. Sin embargo, el monómero hidrofóbico a usar en la presente invención no se restringe a estos ejemplos específicos.

- 10 Ejemplos específicos del bloque hidrofílico a combinar con (o unido a) el bloque anteriormente mencionado que tienen un punto de turbidez puede incluir: metilcelulosa, dextrano, óxido de polietileno, alcohol polivinílico, poli N-vinilpirrolidona, polivinilpiridina, poli(acrilamida), polimetacrilamida, poli N-metil acrilamida, polihidroxi metil acrilato, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido polivinil sulfónico, ácido sulfónico de poliestireno, y sales de estos ácidos; poli N,N-dimetilaminoetil metacrilato, poli N,N-dietilaminoetil metacrilato, poli N,N-dimetilaminopropil acrilamida, y sales de estos, etc.

- 15 El polímero de hidrogel puede comprender poli(etilenglicol) (PEG) (poli (óxido de propileno) y/o poli(óxido de etileno)).

- 20 El polímero de hidrogel puede comprender también un polímero natural. Como se emplea en la presente memoria el término "polímero natural" se refiere a polímeros que aparecen de manera natural así como a polímeros que consisten en componentes naturales. Por tanto, polímeros naturales pueden ser, por ejemplo, polipéptidos o polisacáridos. El hidrogel puede consistir en dicho polímero natural o en un polímero que consiste en componentes naturales, o el hidrogel puede comprender tanto un polímero o polímeros sintéticos como polímeros naturales, que opcionalmente se pueden unir de manera covalente entre sí. Dicho polímero natural puede ser, por ejemplo, un polipéptido que mimetiza sustratos de colagenasa, puede ser matrices extracelulares, fibrinógeno, HA, alginato o chitosán.

- 25 El proceso para combinar el bloque anterior que tiene un punto de turbidez con el bloque hidrofílico no está particularmente limitado. Por ejemplo, se prefiere obtener un copolímero de bloque, o un injerto de copolímero, o un copolímero de tipo dendrímero que contiene estos bloques.

Un 10 por ciento de la disolución acuosa del polímero en hidrogel anterior puede mostrar preferiblemente una viscosidad de 10-3.000 Pa*s (10-3.000 centipoises), más preferiblemente, 50-1.000 Pa*s (50-1.000 centipoises) a 5 grados C.

- 30 Para reducir o prevenir la citotoxicidad, se prefiere usar un polímero-hidrogel que se pueda convertir en un estado de gel a una concentración de 20 por ciento o menos (más preferiblemente 15 por ciento o menos, particularmente 10 por ciento o menos), en donde la concentración es $\{(\text{polímero})/(\text{polímero}+\text{dispersión líquida})\}$.

- 35 El soporte puede comprender también componentes adicionales, por ejemplo, componentes beneficiosos para el mantenimiento y/o crecimiento de las células. Por tanto, en realizaciones de la invención donde el soporte es un hidrogel, entonces además de la dispersión líquida y del polímero en hidrogel, el soporte puede comprender también componentes adicionales.

Dichos componentes adicionales pueden ser, por ejemplo, antibióticos, ECM tales como colágeno o gelatina, hormonas tales como insulina y factores de crecimiento, y otras células o tejidos capaces de secretar los mismos, o derivados de ácidos grasos, tales como prostaglandinas.

- 40 El soporte también puede ser un co-polímero, por ejemplo, un co-polímero seleccionado del grupo que consiste en organogeles de lecitina pluronic e hidrogeles de alginato.

El hidrogel compatible con las células a usar con la invención puede ser, por ejemplo, un gel gelatinoso. Ejemplos de geles gelatinosos incluyen Matrigel™ y Purage™.

- 45 Ejemplos de hidrogeles compatibles con las células útiles para usarse con la invención y métodos para diseñarlos se describen por Seliktar, 2012, Science, 336:1124-1128. Ejemplos específicos de hidrogeles útiles para usarse con la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en h9e, Matrigel™, Purage™, Pluronic, Puramatrix, e hidrogel de alginato. En las Tablas 1 y 2 de a continuación se proporcionan otros ejemplos de hidrogeles útiles.

Tabla 1.

Características	h9e	Gel Puramatrix (BD Biosciences) [a]	Matrigel (BD Biosciences) [b]	Hidrogel de alginato ALgimatrix) [c]
Material	Péptido (unidad 19)	Péptido (unidad 16)	Membrana basal reconstituida extraída del EHS de un tumor de ratón	Polisacáridos (esponja seca)
Porosidad	50-200 nm	50-200 nm	50-400 nm	50-200 µm
pH de la disolución	Neutra	Ácida pH 3	Varias durante el almacenamiento (de pH ácido a fisiológico)	Seco
Gel activador	El hidrogel se puede activar directamente mezclando el medio celular o la disolución que contiene Ca ²⁺ , Na ⁺ (sin ajuste de pH ni de temperatura)	Comenzar con el gel a un pH superior de 4,5-5 (cambiar el medio al menos 3 etapas dentro de los primeros 30 min para equilibrar la muestra a pH fisiológico).	Comenzar con el gel a una temperatura superior a 10°C	Añadir al gel tampón reafirmante que contiene Ca ²⁺
Encapsulación celular	Mezclar directamente (pipetear), las células suspendidas en el medio celular antes de añadir la disolución peptídica en un ambiente de trabajo relajado. Las células son rodeadas por el medio y la red de nanofibrillas durante la hidrogelificación.	Mezclar directamente (pipetear, tiene que ser muy rápido, dentro de 1 min, para acortar el tiempo de contacto de las células con la disolución peptídica ácida); las células se aíslan del medio y se preparan en una disolución de sacarosa al 10% antes de añadir la disolución peptídica	Mezclar directamente con la pipeta enfriada (se necesita enfriar todo antes del experimento por que la temperatura es la activadora de la gelificación)	Centrifugar inmediatamente después de añadir el tampón reafirmante (para una mejor distribución celular)
Recuperación celular	Pipetear, diluir el hidrogel con el medio celular 1:15 veces y centrifugar	Pipetear para romper la estructura del gel y centrifugar	Añadir la disolución de recuperación celular o disminuir la temperatura o centrifugar para romper la matriz del gel	Añadir el tampón de disolución

Tabla 2

Material	Precusores del gel	Mecanismo de reticulación	Mecanismo de degradación	Células encapsuladas
Chitosán	Macrómero(s): injerto de chitosán con ácido láctico y metacrilato	Covalente	Enzimático (lisozima)	Condrocitos ¹²
	Iniciador: APS/TEMEDA		Hidrolítico ^b	
	Macrómero(s): chitosán-g-ácido azidobenzoico y acrilolil-PEG-RGD	Covalente	Enzimático (lisozima)	Cardiomicitos ⁹⁸
Alginato-co-Gelatina	Macrómero(s): alginato dialdehído y gelatina	Covalente	Hidrolítico	Hepatocitos ⁹⁰
	Agente de reticulación: Borax ^é			
Gelatina estirenada	Macrómero(s): gelatina estirenada	Covalente	Enzimático	Condrocitos ⁷²
	Iniciador: canforquinona			
HA	Macrómero(s): HA metacrilatado	Covalente	Enzimático (Hialuronidasa)	Células intersticiales valvulares, ⁵⁹ condrocitos, ^{106,134} fibroblastos ¹³⁵
	Iniciador: Irgacure 2959			
	Macrómero(s): HA acrilatado y PEG-(SH) ₄	Covalente	Enzimático (Hialuronidasa)	MSCs Humanas ²⁶
	Otro: trietanolamina (pH 8,0)			
	Macrómero(s): tiol modificado HA y PEG diacrilato	Covalente	Enzimático	Células del sistema adipocitario, ¹⁰⁹ pollo
	PEG diacrilato		(Hialuronidasa) ^b	Ganglios de la raíz dorsal ¹¹⁰
Condroitín sulfato	Macrómero(s): Condroitín sulfato metacrilatado	Covalente	Enzimático (Condroitinasa)	Condrocitos ^{61,62}
	Iniciador: Irgacure 2959			
Análogos ECM	Macrómero(s):	Covalente	Enzimático ^b	Fibroblastos murinos, ²⁸

sintéticos	HA tiol-modificados o condroitín sulfato tiol-modificado, gelatina tiol-modificada y PEG diacrilato			MSCs ¹¹³
Fibrinógeno PEGilado	Macrómero(s): Fibrinógeno-g-PEGacrilolil y PEG diacrilato	Covalente	Enzimático (plasmina, MMPs)	Células estromales de la médula ósea ⁸⁵
	Iniciador: Irgacure 2959			
Geles peptídicos auto-ensamblados	Macrómero(s): Péptido auto-ensamblado	Físico	Disolución o enzimático ^d	MSCs Humanas, ⁷⁵ preosteoblastos, ⁸⁴ células endoteliales, ¹³⁶ cardiomiocitos, ¹³⁷ SCs embrionicas ¹³⁷
	Otro: disoluciones electrolíticas (por ejemplo, sacarosa, DMEM)			
Elastina similar a polipéptido	Macrómero(s): ELP modificados genéticamente	Covalente	Enzimático	Condrocitos ⁷⁷ , SCs derivadas del adipocito ⁷⁸
	Otro: tejido de transglutaminasa y cloruro cálcico			
	Macrómero(s): PAG- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PLA dimetacrilato	Covalente	Hidrolítico	Osteoblastos ³⁹ , células precursoras neurales ¹³⁸
	Iniciador: Irgacure 2959			
Basado en Poli(etilenglicol)	Macrómero(s): PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL dimetacrilato	Covalente	Enzimático (lipasa) Hidrolítico	Condrocitos ¹³⁹
	Iniciador: Irgacure 2959			
	Macrómero(s): PEG-(ácido poli(glicerol succínico metacrilato ₄)) ₂	Covalente	Hidrolítico	Condrocitos ³⁷
	Iniciador: Eosina-Y, NVP, trietanolamina			
	Macrómero(s): OPF y NVP	Covalente	Hidrolítico	Condrocitos ¹²⁶
	Iniciador: Irgacure 2959			

Basado en polifumarato	Macrómero(s): poli(láctido-co-óxido de etileno-co-fumarato) y MMP-diacrilato	Covalente	Hidrolítico Enzimático (MMPs)	Células estromales de la médula ósea ¹³³
	Iniciador: APS/TEMDA			
	Macrómero(s): poli(etilenglicol) di-[etil fosfatidil (etilenglicol)metacrilato]	Covalente	Hidrolítico	MSCs ⁵¹ de cabra
	Iniciador: Irgacure 2959			
Fosfoéster	Macrómero(s): acrilato de poli(6-aminohexilpropileno fosfato)	Covalente	Hidrolítico	MSCs ¹²⁵ de cabra
	Iniciador: Irgacure 2959			

^bLa degradación puede ocurrir sólo a través de la hidrólisis.

^cAdemás de bórax, el gel también forma entrecruzamientos entre los grupos amino en la gelatina y los grupos aldehído en el alginato.

^dNo confirmado.

- 5 APS: persulfato de amonio; TEMDA: *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina; PEG: poli(etilenglicol); HA: ácido hialurónico; Irgacure 2959: 2-hidroxi-1-[4-(hidroxietoxi)fenol]-2-metil-1-propanona; ECM: matriz extracelular; MSCs: células madre mesenquimales; MMPs: metaloproteinasas; DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco; ELP: péptidos similares a Elastina; PLA: ácido poli(láctico); PCL: poli(8-caprolactona); NVP: *N*-vinilpirrolidona; OPF: oligo(polietilenglicol) fumarato.
- 10 El manejo estándar del Matrigel es mantenerlo a baja temperatura (por ejemplo, en el intervalo de 0 a 8°C, por ejemplo, a una temperatura en el intervalo de 0 a 5°C) mientras se añaden las células. Después de que las células se embeban en el gel, se alcanza la temperatura en el intervalo de 20°C a 40°C, tal como en el intervalo de 22°C a 37°C y el Matrigel gelificará (introducir la fase gel). Las células permitirán ahora el crecimiento en la estructura 3D. Se pueden tratar de una manera similar otros hidrogeles que tienen una temperatura de transición sol-gel en el intervalo de 10 a 35°C.

Matrices

Las matrices a emplear con la presente invención comprenden una pluralidad de espacios, cada uno comprende un soporte y un miembro de biblioteca.

- 20 Las matrices pueden comprender también espacios, que no comprenden soporte o miembro de biblioteca. La matriz puede comprender también espacios que sólo comprenden un soporte. Tales espacios se pueden emplear como controles.

Generalmente es de importancia que la matriz comprenda espacios discretos, tal que el soporte de un espacio no se pueda mezclar fácilmente con el soporte de otro espacio.

- 25 En una realización la matriz puede comprender el soporte como puntos o regiones sobre una superficie o un gel chapado o una membrana. Un punto o una región es un espacio discreto en dicha superficie, donde se posiciona el soporte. El soporte se mantiene dentro del espacio incluso en el estado sol, por ejemplo, debido a la tensión superficial. Por tanto, cada punto puede comprender miembros de biblioteca específicos, que están confinados en dicho punto. Otros componentes (por ejemplo, la suspensión celular) se pueden distribuir a lo largo de toda la matriz. De la misma manera, se puede ensayar el fenotipo celular en respuesta a diferentes miembros en diferentes puntos, pero al mismo tiempo, además la suspensión celular no requiere de pipeteo excesivo, el cual puede ser dañino para las células. En tales realizaciones de la invención el volumen del soporte colocado en cada espacio es muy pequeño. Por tanto, preferiblemente debería ser lo suficientemente pequeño como para que el soporte se mantenga dentro del espacio debido a la tensión superficial. Dicha superficie será, por ejemplo, una oblea de silicio, una

superficie de vidrio, una superficie plástica o un gel. La superficie plástica se puede preparar, por ejemplo, a partir de poliestireno, policarbonato polipropileno, etileno y/o teflón. Los geles se podrán preparar a partir de, por ejemplo, poliacrilamida o PEGA.

5 En realizaciones preferidas de la invención la matriz comprende espacios, que se separan unos de otros mediante barreras físicas. Por tanto, por ejemplo, la matriz puede comprender una pluralidad de pocillos.

10 En una realización muy preferida de la invención, la matriz comprende una pluralidad de compartimentos, que están conectados a un reservorio. Dicha pluralidad de compartimentos pueden ser, por ejemplo, pocillos. Por tanto, cada pocillo puede comprender compuestos específicos, por ejemplo, miembros de biblioteca, que están confinados en dicho pocillo, mientras que otros componentes (por ejemplo, la suspensión celular) se pueden añadir al reservorio y desde allí distribuirse a cada pocillo. De la misma manera, se puede ensayar el fenotipo celular en respuesta a diferentes miembros de biblioteca en diferentes pocillos, pero al mismo tiempo, además la suspensión no requiere de pipeteo excesivo, el cual puede ser dañino para las células y/o dar como resultado una pérdida de células.

15 La matriz puede comprender tantos espacios, por ejemplo, tantos pocillos, como se deseen. En general la matriz debe comprender los suficientes espacios (por ejemplo, pocillos) como para que cada miembro de biblioteca se pueda ensayar en un espacio o pocillo diferente. Por tanto, la matriz puede comprender al menos 10, tal como al menos 20, por ejemplo, al menos 40, tal como al menos 50, por ejemplo, al menos 60, tal como al menos 70, por ejemplo, al menos 80, por ejemplo, al menos 90 espacios o pocillos. Por ejemplo, la matriz puede comprender en el intervalo de 10 a 100, tal como en el intervalo de 20 a 100, por ejemplo en el intervalo de 40 a 100, tal como en el intervalo de 50 a 100, por ejemplo en el intervalo de 60 a 100, tal como en el intervalo de 70 a 100 espacios o pocillos. Cada espacio o pocillo puede comprender un miembro de biblioteca diferente, en donde se prefiere que al menos un espacio o pocillo no comprenda un miembro de biblioteca y, por tanto, pueda servir como control. La invención también comprende que varios espacios o pocillos comprendan el mismo miembro de biblioteca, pero en diferentes concentraciones. De esta manera, se puede establecer una curva de dosis-respuesta para determinar si el miembro de biblioteca modifica la respuesta celular. Se prefiere que al menos dos, tal como al menos 10, tal como al menos 20, por ejemplo, al menos 40, tal como al menos 50, por ejemplo, al menos 60, tal como al menos 70, por ejemplo, al menos 80, por ejemplo, al menos 90, pocillos o compartimentos comprendan diferentes miembros de biblioteca.

30 Una ventaja de la presente invención es que cada espacio puede ser muy pequeño permitiendo un ensayo fácil de numerosos miembros de biblioteca opcionalmente en concentraciones diferentes. Por tanto, la matriz puede comprender compartimentos o pocillos, en donde cada compartimento o pocillo tiene un volumen de como máximo 50 μL , preferiblemente como máximo 40 μL , más preferiblemente como máximo 30 μL , por ejemplo, como máximo 20 μL , por ejemplo, cada compartimento o pocillo puede tener un volumen en el intervalo de 10 a 25 μL . Los pocillos o compartimentos de la matriz pueden ser de un tamaño diferente, pero se prefiere que todos los pocillos o compartimentos de una matriz sean del mismo tamaño.

35 Una ventaja de los métodos de la presente invención es que no hay derrame de un miembro de biblioteca de un espacio/pocillo/compartimento a los espacios/pocillos/compartimentos vecinos, incluso cuando alguno de los componentes (por ejemplo, la suspensión celular) se añade a la matriz en una o más etapas. Este es el incluso el caso en realizaciones de la invención donde los pocillos o compartimentos se posicionan en los alrededores entre sí. Por tanto, la matriz puede comprender al menos dos compartimentos o pocillos, que se separan mediante una barrera física que tiene un grosor de como máximo 2 mm, tal como máximo 1 mm. Se prefiere que la distancia entre cualquier compartimento o pocillo y su compartimento o pocillo vecino sea como máximo 2 mm, tal como máximo 1 mm.

La matriz se puede preparar a partir de cualquier materia útil, tal como a partir de un plástico. Por ejemplo, la matriz puede ser un dispositivo que pueda tener una masa producida mediante moldeado por inyección.

45 En realizaciones preferidas de la invención, la matriz se prepara de tal manera que se conoce qué miembro de biblioteca está contenido en cada espacio/compartimento/pocillo. También se prefiere que se conozca la concentración del miembro de biblioteca en un espacio/pocillo/compartimento dado. De esta manera, después de la incubación se pueden inspeccionar los espacios/pocillos/compartimentos de la matriz, donde el fenotipo celular se ha modificado, y después se pueden determinar directamente los compuestos o la combinación de compuestos que modifican el fenotipo celular.

50 La matriz se puede preparar y suministrar a un usuario de una manera en particular, donde la matriz está lista para usar, para que el usuario sólo tenga que añadir la suspensión celular e incubar la matriz. Después de la incubación las células se inspeccionan para determinar el fenotipo celular y en base de los conocimientos de qué espacio/compartimento/pocillo comprende cada miembro de biblioteca, se pueden determinar los compuestos o la combinación de compuestos que modifican el fenotipo celular.

La invención comprende también, sin embargo, que cada espacio/compartimento/pocillo comprenda un miembro de biblioteca aleatorio. Después de la identificación de un espacio/compartimento/pocillo que comprende células donde el fenotipo celular se ha modificado, entonces se puede determinar el miembro de biblioteca contenido en dicho

espacio/compartimento/pocillo. Esto se puede realizar mediante espectrometría de masas, NMR o cualquier otro método útil para determinar la estructura de un compuesto químico. Los métodos para determinar la estructura de un compuesto se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO2005/116656 en la sección "identificación de un compuesto" que comienza en la p. 61.

5 La biblioteca también se puede preparar mediante síntesis paralela empleando un marcador para facilitar la identificación de qué etapas de la síntesis química del miembro de biblioteca se han presentado. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante IRORI o marcaje por radiofrecuencia. Alternativamente, las etapas de síntesis química se pueden realizar en paralelo para preparar un marcador polimérico. La identificación del marcador proporcionará, por tanto, el conocimiento del compuesto.

10 Enlace de los miembros de biblioteca al soporte

La invención comprende el uso de matrices que comprenden un soporte que comprende miembros de biblioteca. Preferiblemente, los espacios/compartimentos/pocillos de la matriz comprenden diferentes miembros de biblioteca mezclados con el soporte. Dichos miembros de biblioteca se pueden distribuir uniformemente en el soporte, sin embargo, no es un requerimiento que los miembros de biblioteca se distribuyan de manera uniforme. En algunas realizaciones los miembros de biblioteca se localizan más frecuentemente en el fondo del espacio/compartimento/pocillo, por ejemplo, en realizaciones donde los miembros de biblioteca se encapsulan en partículas.

15 Esto se puede lograr mediante el mezclado del soporte con el miembro de biblioteca, mientras el soporte está en el estado de sol. En principio esto se puede conseguir mediante una de las formas siguientes:

- 20
- 1) el miembro de biblioteca se añade al espacio/pocillo/compartimento
 - 2) el soporte en estado sol se añade al espacio/pocillo/compartimento
 - 3) se mezclan el soporte en estado sol y los miembros de biblioteca.

Alternativamente, esto se puede realizar como sigue:

- 25
- 4) el soporte en estado sol se añade al espacio/pocillo/compartimento
 - 5) opcionalmente el soporte se lleva al estado de gel
 - 6) el miembro de biblioteca se añade al espacio/pocillo/compartimento
 - 7) si el soporte está en el estado de gel, el soporte se lleva al estado sol
 - 8) se mezcla el estado sol y los miembros de biblioteca.

Alternativamente, esto se puede realizar como sigue:

- 30
- 1) el soporte en estado sol se mezcla con el miembro de biblioteca
 - 2) la mezcla se añade al espacio/pocillo/compartimento

35 Dependiendo de la naturaleza del soporte, el soporte se puede llevar al estado sol mediante varios métodos. En realizaciones de la invención, en donde el soporte es un sol-gel con una temperatura de transición, entonces esto se realiza mediante transferencia de la matriz a una temperatura, en donde el sol-gel está en el estado sol. Normalmente, esto se realiza mediante transferencia de la matriz a una temperatura por debajo de la temperatura de transición de dicho sol-gel.

En realizaciones preferidas de la presente invención los miembros de biblioteca se añaden al soporte mientras que el soporte está en el estado sol. Los miembros de biblioteca se unirán de manera pasiva al soporte y posteriormente afectan al fenotipo celular después de la difusión pasiva.

40 En otra realización preferida los miembros de biblioteca se encapsulan en estructuras de nano-partículas similares a moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, nucleótidos (para revisiones véase, por ejemplo, Nagarwal et al. 2009, J Control. Release 136, 2-13; Gasco 2007, Adv. Drug Delivery Rev. 59, 377-378) estas estructuras se insertan en el soporte, mientras que el soporte esté en su estado sol antes de la adición de las células. El compuesto o compuestos para ejercer su actividad biológica tendrá que liberarse en la mayoría de los casos a partir de nano-estructuras. Tal liberación puede ocurrir en el espacio extra-celular o después de la entrada de las nano-estructuras en las células. Tal liberación se puede controlar mediante varios estímulos diferentes, por ejemplo, luz, cambio de pH, temperatura, ultrasonido, enzimas, y cambio del potencial redox.

En otra realización preferida los miembros de biblioteca se unirán covalentemente al soporte.

En realizaciones preferidas de la invención miembros específicos se posicionan en la matriz de manera que la

localización del espacio específico describe la identidad del miembro de biblioteca.

5 En otra realización la matriz se diseña de tal manera que se puede controlar el fenotipo celular empleando un dispositivo óptico similar a un microscopio. Además, la matriz se diseña de tal forma que las células se añaden en suspensión y las células se distribuirán a cada uno de los múltiples espacios de la matriz que tiene un miembro de biblioteca específico.

Incubación de la matriz

10 Los métodos de la invención implican una etapa de incubación de una matriz con las células, que puede ser cualquiera de las matrices descritas en la presente memoria anteriormente. La matriz se inspecciona después de la incubación para identificar qué espacios/pocillos/compartimentos comprenden células, donde se ha modificado el fenotipo celular. Una vez que se han identificado los espacios/pocillos/compartimentos, se pueden identificar después los miembros de biblioteca contenidos en dichos espacios/pocillos/compartimentos.

15 Normalmente, las células se proporcionan en forma de una suspensión. Incluso si dichas células no crecen en una suspensión de manera natural, entonces con los fines de la presente invención, generalmente se añaden las células en forma de una suspensión. El experto en la técnica está bien informado de los métodos convencionales para preparar suspensiones celulares. Por ejemplo, las suspensiones celulares se pueden preparar mediante tratamiento enzimático y/o separación física. Por ejemplo, la suspensión celular se puede preparar mediante separación física seguido del tratamiento con una o más enzimas capaces de degradar componentes implicados en la unión celular. Dichas enzimas pueden, por ejemplo, ser enzimas proteolíticas, por ejemplo, tripsina o colagenasa. La suspensión celular puede comprender células más o menos separadas completamente entre sí, o al menos algunas de las células pueden estar en forma de esferoides. Por ejemplo, pueden estar en forma de esferoides, al menos el 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo, al menos 90%, tal como todas las células.

20 La suspensión celular se añade después a la matriz, en donde el soporte (por ejemplo, el hidrogel) está en el estado de gel (por ejemplo, el hidrogel está en fase de gel). Una ventaja de la presente invención es que las células se pueden añadir a la matriz en sólo una etapa o en unas pocas etapas, tal como en como máximo 10 etapas, preferiblemente en como máximo 5 etapas, tal como en como máximo 2 etapas, por ejemplo, en sólo una etapa. Esto es factible, porque los miembros de biblioteca están contenidos dentro del soporte en el estado de gel, que previene el derrame de un espacio a otro.

En realizaciones de la invención en donde la matriz comprende múltiples compartimentos o pocillos conectados a un reservorio, entonces las células se añaden simplemente a dicho reservorio.

30 Normalmente, a las células se les permite instalarse en los pocillos/compartimentos, y el exceso de líquido se puede eliminar, es decir, a las células se les puede permitir establecerse en los pocillos/compartimentos mediante gravedad, y el líquido de la suspensión celular se puede eliminar en el reservorio.

35 Una vez que las células están en contacto con el soporte en los espacios/pocillos/compartimentos, por ejemplo, después de que las células se han instalado en los pocillos/compartimentos, entonces el soporte se lleva al estado sol. Dependiendo de la naturaleza del soporte, el soporte se puede llevar al estado sol mediante varios métodos. En realizaciones de la invención, en donde el soporte está en estado sol-gel con una temperatura de transición, entonces esto se realiza mediante transferencia de la matriz hasta una temperatura, en donde el sol-gel está en el estado sol. Normalmente, esto se realiza mediante transferencia de la matriz a una temperatura por debajo de la temperatura de transición de dicho sol-gel.

40 Una vez que el soporte está en el estado sol, a las células se les permite fluir en el soporte. Esto se puede realizar mediante gravedad. Cuando las células están en la posición deseada el soporte se lleva a un estado de gel atrapando de este modo las células en el soporte. En particular, se prefiere que a las células se les permita establecerse en una zona estrecha, la cual pueda facilitar el control de las células empleando un dispositivo óptico, como un microscopio. Por tanto, preferiblemente, a las células se les permite establecerse en una zona lo suficientemente estrecha como para permitir la inspección de las células con un microscopio, en donde esencialmente todas las células se pueden inspeccionar sin necesidad de cambiar el enfoque de dicho microscopio. En una realización preferida de la invención, a las células se les permitió establecerse en el fondo del pocillo/compartimento. Por tanto, al menos al 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo, al menos 90%, tal como esencialmente todas las células se les permite establecerse en el fondo del pocillo/compartimento, donde después el soporte se lleva al estado de gel. Si a las células se les permite establecerse en el fondo del pocillo/compartimento, esto puede facilitar controlar las células empleando un dispositivo óptico, como un microscopio.

45 Dependiendo de la naturaleza del soporte, el soporte se puede llevar al estado gel mediante varios métodos. En realizaciones de la invención, en donde el soporte está en estado sol-gel con una temperatura de transición, entonces esto se realiza mediante la transferencia de la matriz hasta una temperatura, en donde el sol-gel está en el estado gel. Normalmente, esto se realiza mediante la transferencia de la matriz a una temperatura por encima de la temperatura de transición de dicho sol-gel. Preferiblemente dicha temperatura es también una temperatura que permite el mantenimiento y/o el crecimiento de células. Por tanto, se prefiere que dicha temperatura esté en el intervalo de 30 a 40°C, tal como en el intervalo de 35 a 38°C, por ejemplo, alrededor de 37°C. Dichas temperaturas

son útiles en particular, cuando las células son células mamíferas, tal como células humanas.

5 A la matriz con las células se le permite entonces incubarse en un tiempo suficiente para controlar, si el miembro de biblioteca puede modificar el fenotipo celular. Normalmente, a la matriz con las células se le permite incubarse en el intervalo de 1 a 20 días, tal como en el intervalo de 2 a 10 días. En realizaciones de la invención donde el fenotipo celular es la proliferación celular, entonces normalmente, a la matriz con las células se le permite incubarse durante un intervalo de 5 a 20 días, tal como en el intervalo de 5 a 10 días.

10 Las condiciones de la incubación dependen de las células específicas. Por tanto, la incubación se debería realizar bajo condiciones que permitan el mantenimiento y/o el crecimiento del tipo de células en particular. Para un gran número de células mamíferas, tales condiciones comprenden alta humedad, preferiblemente cercana al 100%, aproximadamente 5% de CO₂ y alrededor de 37°C.

15 En general las matrices contienen un hidrogel que comprende un líquido en dispersión, que es un medio de cultivo celular. Por tanto, puede que no se requiera de un medio de cultivo celular adicional. Después de la incubación la matriz se puede investigar por sus espacios/pocillos/compartimentos que comprenden células, donde se ha modificado el fenotipo celular, y se puede identificar el miembro de biblioteca de estos espacios/pocillos/compartimentos.

Condiciones clínicas

Aunque sin concordancia con la invención como se reivindica, en algunas realizaciones la invención se refiere a métodos para el tratamiento de una afección clínica. En particular, los métodos de la invención son útiles para determinar un régimen de tratamiento útil para un individuo particular.

20 Por tanto, las células obtenidas a partir de un individuo se pueden ensayar frente a una serie de miembros de biblioteca para identificar un miembro de biblioteca, que es útil para el tratamiento de dicho individuo particular.

25 A modo de ejemplo, si un individuo padece de cáncer, las células cancerosas se pueden obtener a partir de dicho individuo. Se puede añadir entonces a la matriz una biblioteca de fármacos y combinaciones de fármacos útiles en el tratamiento del cáncer, y se puede determinar un fármaco o una combinación de fármacos que inhiben o al menos reducen la proliferación de dichas células cancerosas. Dicho individuo se puede tratar entonces con dicho fármaco o combinación de fármacos. En algunas realizaciones dentro de la invención se refieren a métodos para predecir la eficacia de un tratamiento en una afección clínica. En particular, los métodos de la invención son útiles para determinar si un régimen de tratamiento puede ser útil para un individuo particular.

30 Por tanto, las células obtenidas a partir de un individuo se pueden ensayar frente a una serie de miembros de biblioteca para ensayar si alguno de los miembros de biblioteca puede ser útil para el tratamiento de dicho individuo particular.

35 Los métodos de la invención pueden comprender, por tanto, ensayar las células a partir de un individuo que padece de una afección clínica, frente a una serie de miembros para identificar los miembros de la biblioteca que pueden reducir o inhibir un fenotipo celular asociado con la afección clínica. Por tanto, se pueden añadir a la matriz fármacos y combinaciones de fármacos útiles en el tratamiento de dicha afección clínica, y se puede ensayar si alguno de los fármacos o de las combinaciones de fármacos son capaces de inhibir o al menos reducir un fenotipo celular asociado con la afección clínica. Si ninguno de los miembros de la biblioteca es capaz de inhibir o al menos reducir el fenotipo celular, entonces se predice que el tratamiento con alguno de los miembros de la biblioteca tiene poca eficacia y que se debe buscar otro tratamiento. Si por otro lado, uno o más miembros de la biblioteca son capaces de inhibir o al menos reducir el fenotipo celular, entonces dichos miembros de la biblioteca se pueden seleccionar para el tratamiento de dicho individuo.

45 A modo de ejemplo, si un individuo padece de cáncer, las células cancerosas se pueden obtener a partir de dicho individuo. Se pueden añadir después a la matriz una biblioteca de fármacos y combinaciones de fármacos útiles en el tratamiento del cáncer, y se puede ensayar si alguno de los fármacos o de las combinaciones de fármacos son capaces de inhibir o al menos reducir la proliferación de dichas células cancerosas. Si ninguno de los miembros de biblioteca es capaz de inhibir o al menos reducir la proliferación de dichas células cancerosas, entonces se predice que el tratamiento con alguno de los miembros de biblioteca tiene poca eficacia y que se debe buscar otro tratamiento. Si por otro lado, uno o más miembros de biblioteca son capaces de inhibir o al menos reducir la proliferación de dichas células cancerosas, entonces dichos miembros de biblioteca se pueden seleccionar para el tratamiento de dicho individuo.

50 En una realización la invención se refiere a un compuesto o a una combinación de compuestos para el tratamiento de una afección clínica en un individuo que necesita del mismo, en donde la condición clínica se asocia con al menos un fenotipo celular, y en donde el individuo comprende células asociadas con la afección clínica, en la que dicho compuesto o combinación de compuestos son capaces de modificar dicho fenotipo celular, en donde el compuesto o combinación de compuestos se han identificado mediante los métodos de la invención.

55 Por tanto, la invención puede referirse a un compuesto o una combinación de compuestos para el tratamiento de

una afección clínica en un individuo que necesita del mismo, en donde la afección clínica se asocia con al menos un fenotipo celular, y en donde el individuo comprende células asociadas con la afección clínica, en la que dicho compuesto o combinación de compuestos son capaces de modificar dicho fenotipo celular, en donde el compuesto o combinación de compuestos se han identificado mediante el método que comprende las etapas de:

- 5 i) proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de espacios, en donde cada espacio comprende un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar entre un estado sol y un estado gel; y en donde al menos 2 espacios comprenden además diferentes miembros de biblioteca; y en donde cada miembro de biblioteca es un fármaco o una combinación de fármacos útiles en el tratamiento de dicha afección clínica, y en donde el soporte está en el estado de gel
- 10 ii) proporcionar una suspensión de células obtenidas a partir de dicho individuo, en donde las células se asocian con la afección clínica y las células pueden adquirir el fenotipo celular;
- iii) llevar el soporte al estado de gel;
- iv) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células; y
- 15 v) llevar el soporte al estado sol en donde las etapas iv) y v) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden, permitiendo de este modo que las células fluyan en el soporte; y
- vi) llevar el soporte al estado de gel atrapando de este modo a las células en el soporte; y
- vii) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el mantenimiento y/o el crecimiento de las células,
- viii) detectar el fenotipo celular en las células,
- ix) identificar a los miembros de biblioteca que modifican el fenotipo celular.

20 En una realización las etapas iv) y v) se realizan en el siguiente orden:

- i) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células, mientras que el soporte está en el estado de gel; y
- ii) llevar el soporte al estado sol.

25 En una realización, la invención se puede referir a un fármaco o a una combinación de fármacos para el tratamiento del cáncer en un individuo que necesita del mismo, en donde se ha identificado el fármaco o la combinación de fármacos mediante el método que comprende las etapas de:

- 30 i) proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de espacios, en donde cada espacio comprende un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar entre un estado sol y un estado gel; y en donde al menos 2 espacios comprenden además diferentes miembros de biblioteca; y en donde cada miembro de biblioteca es un fármaco o una combinación de fármacos útiles en el tratamiento del cáncer, y en donde el soporte está en el estado de gel
- ii) proporcionar una suspensión de células cancerosas obtenidas a partir de dicho individuo;
- iii) llevar el soporte al estado de gel;
- iv) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células; y
- 35 v) llevar el soporte al estado sol, en donde las etapas las etapas iv) y v) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden, permitiendo de este modo que las células fluyan en el soporte; y
- vi) llevar el soporte al estado de gel atrapando de este modo a las células en el soporte; y
- vii) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el crecimiento de las células
- viii) detectar la proliferación de células cancerosas,
- 40 ix) identificar los miembros de biblioteca que modifican la proliferación de células cancerosas.

En una realización las etapas iv) y v) se realizan en el siguiente orden:

- i) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células, mientras que el soporte está en el estado de gel; y
- ii) llevar el soporte al estado sol.

45 Es también un aspecto de la invención proporcionar un método para predecir la eficacia del tratamiento de un cáncer

en un individuo que necesita del mismo, en donde el método comprende:

- i) proporcionar células cancerosas a partir de dicho individuo, que opcionalmente puede estar en forma de esferoides;
- 5 ii) proporcionar una matriz, que puede ser cualquiera de las matrices descritas en la presente memoria a continuación en la sección "Matriz", en donde la matriz comprende un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar entre un estado sol a un estado de gel en la temperatura de transición sol-gel y en donde la matriz comprende una biblioteca de miembros de biblioteca, en donde los miembros de biblioteca son fármacos útiles en el tratamiento del cáncer o una combinación de fármacos útiles en el tratamiento del cáncer; y
- 10 iii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con las células;
- iv) llevar el soporte al estado sol mediante incubación a una temperatura por debajo de la temperatura de transición sol-gel; en donde la etapa iii) y iv) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden, permitiendo de este modo que las células fluyan en el soporte; y
- 15 v) llevar el soporte al estado de gel mediante incubación a una temperatura por encima de la temperatura de transición sol-gel, atrapando de este modo a las células en el soporte; y
- vi) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el crecimiento de células cancerosas
- vii) detectar la proliferación de células y/o el crecimiento de los esferoides
- viii) identificar un fármaco útil en el tratamiento del cáncer o una combinación de fármacos útiles en el tratamiento del cáncer, que es capaz de inhibir la proliferación de dichas células cancerosas y/o el crecimiento de dichos esferoides, en donde dicho fármaco o combinación de fármacos son útiles para el tratamiento del cáncer en dicho individuo.
- 20

Como se explica anteriormente, dichos métodos implican el uso de células obtenidas a partir de un individuo que padece de una afección clínica. En particular, se prefiere que las células sean las causantes de dicha afección clínica. Por tanto, a modo de ejemplo, si la afección clínica es cáncer, entonces las células son preferiblemente células cancerosas, tal como células cancerosas primarias de dicho individuo. Tales células cancerosas se pueden obtener después de una cirugía o mediante biopsia. La invención también comprende que se pueda proporcionar una mezcla de células. En tales casos se prefiere que al menos un tipo de células sean las causantes de las afecciones clínicas, y que al menos un tipo de célula esté implicada en la afección clínica. Si la afección clínica es una afección causada por o que implica un crecimiento celular neoplásico, entonces las células son preferiblemente células neoplásicas.

Por tanto, la afección clínica puede ser una afección causada por o que implica el crecimiento de células neoplásicas, tal como tumores benignos, cáncer, enfermedad inflamatoria y enfermedad inmunológica, enfermedad autoinmune, o enfermedades infecciosas.

En una realización preferida de la invención, la afección clínica es cáncer. El cáncer (neoplasia maligna) es una clase de enfermedad en la que un grupo de células muestra características de crecimiento descontrolado (crecimiento y división por encima de los límites normales), invasión (intrusión y destrucción de tejidos adyacentes), y algunas veces metástasis (propagación a otras localizaciones en el cuerpo a través de la linfa o la sangre). Estas tres propiedades malignas de los cánceres los diferencian de los tumores benignos, que están auto-limitados, no invaden o producen metástasis. La mayoría de los cánceres forman un tumor pero algunos, como la leucemia, no lo hacen.

Un grupo no limitante de cánceres proporcionado como ejemplos de cánceres que se pueden tratar, controlar y/o donde se puede predecir la eficacia del tratamiento mediante los métodos de la presente invención incluyen: carcinoma de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de próstata, fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, sarcoma linfangeoendotelial, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, liomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadecarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioblastomas, neuronomas, craneofaringiomas, schwannomas, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma del acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemias y linfomas, leucemia linfocítica aguda y policitemia vera mieloide aguda, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, y enfermedad de la cadena pesada, leucemias no linfocíticas agudas, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, enfermedad de Hodgkin, linfomas no hodgkinianos, cáncer del recto, cánceres urinarios, cánceres uterinos, cánceres orales,

5 cánceres cutáneos, cáncer de estómago, tumores cerebrales, cáncer de hígado, cáncer laríngeo, cáncer esofágico, tumores mamarios, leucemia linfocítica aguda nula infantil (ALL, de sus siglas en inglés), ALL tímica, ALL de linfocitos B, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica, leucemia megacariocítica aguda, linfoma de Burkitt, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, y leucemia de linfocitos T, carcinoma amicrocítico y no microcítico de pulmón, leucemia granulocítica aguda, tumores de células germinativas, cáncer endometrial, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas y cáncer de tiroides.

Por ejemplo, el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de pulmón.

Ejemplos

10 La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no están hechos como limitantes para la invención.

A través de los ejemplos el término "Fluido" se emplea para indicar que el soporte está en el estado sol, mientras que el término "Sólido" se emplea para indicar que el soporte está en el estado de gel.

Ejemplo 1:

15 Carga de la matriz con compuestos quimio-terapéuticos distribuidos "libremente" en el soporte como únicos compuestos y en combinaciones a varias concentraciones y proporciones

Materiales y disoluciones

- Soporte: Matrigel® disponible en BD Biosciences.
- 20 • Matrices: matrices en formato de micro portaobjetos con 96 pocillos individuales rodeados por un reservorio común. Cada pocillo tiene un volumen de 20 µL y la distancia entre pocillos vecinos tiene 1 mm.
- Compuestos quimio terapéuticos (Irinotecán, Oxaliplatino, Leucovorina, 5FU, Cetuximab).
- Dispositivo de enfriamiento para el mantenimiento a 5°C.

Procedimiento

25 Los compuestos, el Matrigel® y las matrices se mantuvieron a 5°C (dispositivo de enfriamiento) a lo largo del proceso cuando no estaban en el congelador.

1. Los compuestos se diluyeron en Matrigel® (Fluido) como únicos compuestos y/o en combinaciones iguales a los regímenes de tratamiento estándar de pacientes con cáncer colorrectal.
2. Se añadió el Matrigel® con los compuestos a los pocillos individuales de las matrices (Fluido).
3. Las matrices se centrifugaron 10 minutos a 3000RPM (frío).
- 30 4. Las matrices se almacenaron a -18°C (Sólido)- listo para usar.

Ejemplo 2:

Carga de matrices con compuestos de ensayo embebidos en nano-partículas termo sensibles distribuidas en Matrigel; para una liberación demandada

Materiales y disoluciones:

- 35 • Nano-partículas que contienen compuestos quimio terapéuticos
- Soporte: Matrigel® disponible en BD Biosciences
- Matrices: matrices en formato de micro portaobjetos con 96 pocillos individuales rodeados por un reservorio común como se describe en el Ejemplo 1
- Dispositivo de enfriamiento para el mantenimiento a 5°C

40 Procedimiento:

Las nano-partículas, el Matrigel® y las matrices se mantuvieron a 5°C (bloque refrigerador) a lo largo del proceso cuando no estaban en el congelador.

1. El compuesto que contienen las nano-partículas se diluyeron en Matrigel® (fluido).

2. El Matrigel® que contiene las nano-partículas (a partir del punto 1 anterior) se añadió a los pocillos individuales de la matriz.
3. Las matrices se centrifugaron 10 minutos a 3000RPM (frío).
4. Las matrices se almacenaron a -18°C durante 24 horas. (Sólido).

5 Ejemplo 3:

No ocurre el derrame entre pocillos porque el soporte está sólido cuando las células se añaden al reservorio

Materiales y disoluciones:

- Soporte: Matrigel® disponible en BD Biosciences.
- 10 • Matrices: matrices en formato de micro portaobjetos con 96 pocillos individuales rodeados por un reservorio común como se describe en el Ejemplo 1.
- Compuesto químico terapéutico: Doxorubicina.
- Dispositivo de enfriamiento para el mantenimiento a 5°C.

Procedimiento:

15 Los compuestos, el Matrigel® y las matrices se mantuvieron a 5°C (dispositivo de enfriamiento) a lo largo del proceso cuando no estaban en el congelador.

1. Se diluyó la Doxorubicina en Matrigel® (Fluido)
2. Se añadió el Matrigel® con Doxorubicina a los pocillos individuales de las matrices (Fluido)
3. La matriz se centrifugó 10 minutos a 3000RPM (frío)
4. La matriz se almacenó a -18°C durante 24 horas. (Sólido)
- 20 5. Se preparó el tejido tumoral del paciente para formar una población de pequeños micro-tumores individuales (esferoides)
6. Los micro-tumores se suspendieron en el medio STEM frío
7. La matriz se cogió directamente del congelador y se colocó en el dispositivo de enfriamiento (sólido)
8. La suspensión del micro tumor se añadió al reservorio de la matriz
- 25 9. La matriz se dejó durante 7 minutos para permitir que las células se distribuyeran y establecieran en los pocillos individuales de la matriz
10. Se eliminó suavemente el medio STEM del reservorio - dejando a los micro tumores en los pocillos
11. La matriz se cambió al refrigerador (5°C) y se dejó durante 30 minutos para permitir al Matrigel® gelificar y que las células se establecieran en el fondo de la matriz (fluido)
- 30 12. A continuación la matriz se incubó a 37°C durante 1 hora para permitir al Matrigel® solidificar y fijar las células en una determinada posición (sólido)
13. La matriz con los micro-tumores posicionados en el fondo se visualizaron en un microscopio automático
14. La matriz se incubó a 37°C y se obtuvieron imágenes cada día durante 10 días y se midió el crecimiento (y la inhibición del crecimiento) del micro-tumor mediante cuantificación del área de los micro-tumores.
- 35 Como se muestra en la figura 1 después de la presencia de un agente citotóxico (doxorubicina) en el pocillo vecino no hubo un efecto significativo sobre el crecimiento del tumor del esferoide. Por consiguiente, se puede concluir que no hay derrame entre los pocillos.

Ejemplo 4:

Cribado de compuestos distribuidos en el Soporte; Matrigel®

40

Materiales y disoluciones:

- Matriz preparada como la que se describe en el Ejemplo 1
- Medio STEM: DMEM/F12 w. 15% Hepes (Gibco 11330-032), StemPro hESC SFM suplemento de crecimiento (50x):1x
- 5 BSA 25%, Gibco A10008-01: 1,8%, FGF-básico (10ug/ml): 8ng/ml, 2-M Mercaptoetanol Gibco 21985 (55mM): 0,1 mM, Penicilina/estreptomicina 200U/ml/200 ug/ml (= 2x conc. habitual), Gentamicina Sigma G1272: 1:100: (= 2x conc. habitual), Anfotericina (fungicida): 1:100 (= 1x conc. habitual), Hepes 15 mM
- Dispositivo de enfriamiento para el mantenimiento a 5°C
- Incubadora, 37°C (CO₂, 99% de humedad para cultivo celular)

10 Procedimiento:

1. Se preparó el tejido tumoral del paciente para formar una población de pequeños micro-tumores individuales (esferoides)
2. Los micro-tumores se suspendieron en el medio STEM frío
3. La matriz se cogió directamente del congelador y se colocó en el dispositivo de enfriamiento (sólido)
- 15 4. Se añadieron 3 ml de la suspensión del micro tumor al reservorio de la matriz y
la matriz se dejó durante 7 minutos para permitir que las células se distribuyeran y establecieran en los pocillos individuales de la matriz
5. Se eliminó suavemente el medio STEM del reservorio - dejando a los micro tumores en los pocillos
- 20 6. La matriz se cambió al refrigerador (5°C) y se dejó durante 30 minutos para permitir al Matrigel® gelificar y que las células se estableciesen en el fondo de la matriz (fluido)
7. A continuación la matriz se incubó a 37°C durante 1 hora para permitir al Matrigel® solidificar y atrapar a las células en una determinada posición (sólido)
8. La matriz con los micro-tumores posicionados en el fondo se visualizaron en un microscopio automático
- 25 9. Se obtuvieron imágenes cada día durante 10 días y se midió el crecimiento (y la inhibición del crecimiento) del micro-tumor mediante cuantificación del área de los micro-tumores.

En la figura 2a y 2b se muestran ejemplos de los resultados conseguidos, que muestran la inhibición del crecimiento mediante un grupo de quimio-terapias estándar en concentraciones crecientes. En general la proliferación de células cancerosas como se pone de manifiesto mediante el crecimiento de esferoides (micro-tumores) se consideró inhibida si el esferoide tenía un crecimiento inferior al 1,5x del tamaño original después de 7 días de incubación al menos en las concentraciones más altas ensayadas. En la figura 2a, en el paciente 1 la proliferación de células cancerosas se inhibe por 5FU y SN38, pero no por Oxaliplatino, Leucovorina y Cetuximab. En el paciente 2 la proliferación de células cancerosas se inhibe por 5FU, SN38 y Oxaliplatino, pero no por Leucovorina y Cetuximab. Por tanto, puede ser ventajoso tratar al paciente 1 con 5FU y/o SN38, pero no con Oxaliplatino, Leucovorina o Cetuximab. De manera similar, puede ser ventajoso tratar al paciente 2 con 5FU, SN38 y/o Oxaliplatino, pero no con Leucovorina y Cetuximab.

En la figura 2b las células de tres pacientes diferentes muestran baja, moderada y alta sensibilidad respectivamente, para un grupo de tratamientos estándar como monoterapia y terapia de combinación. Las células del paciente con baja sensibilidad responde poco tanto para compuestos en solitario como para compuestos en combinación, mientras que las células del paciente con alta sensibilidad responde bien tanto a la terapia con compuestos en solitario como en la terapia de combinación. Las células del paciente con sensibilidad moderada muestra baja sensibilidad por los compuestos en solitario pero responde bien a las terapias de combinación.

Hasta la fecha los resultados de cribado ensayados están en concordancia con la respuesta del paciente a la terapia. En la figura 2c la exploración por TAC del paciente que muestra sensibilidad moderada muestra correspondencia con los resultados de cribado (mostrados en la figura 2b) en la que se observa la remisión del tumor después del tratamiento con compuestos previstos por ser eficaces en el ensayo de cribado.

La figura 3 muestra un ejemplo del tiempo real del crecimiento del micro-tumor (esferoide) en presencia o ausencia de Irinotecán. En el ejemplo mostrado, el Irinotecán inhibe con claridad la proliferación de células cancerosas.

Ejemplo 5:

Cribado de compuestos distribuidos en Pluronic®

Materiales y disoluciones:

- Matriz preparada según el Ejemplo 1 empleando Pluronic® 20% en medio STEM en lugar de Matrigel®
- 5
- Medio STEM: DMEM/F12 w. 15% Hepes (Gibco 11330-032), StemPro hESC SFM suplemento de crecimiento (50x):1x
BSA 25%, Gibco A10008-01: 1,8%, FGF-básico (10ug/ml):8ng/ml, 2-Mercaptoetanol Gibco 21985 (55 mM): 0,1 mM, Penicilina/estreptomicina 200U/ml/200ug/ml (= 2x conc. habitual), Gentamicina Sigma G1272: 1:100: (= 2x conc. habitual), Anfotericina (fungicida): 1:100 (= 1x conc. habitual), Hepes 15 mM
- 10
- Incubadora, 37°C (CO₂, 99% de humedad para cultivo celular)
- Procedimiento:
1. Se preparó el tejido tumoral del paciente para formar una población de pequeños micro-tumores individuales (esferoides)
 2. Los micro-tumores se suspendieron en medio STEM pre-calentado a 37°C

15

 3. La matriz (almacenada en el congelador) se incubó a 37°C durante 1 hora para permitir al Pluronic® entrecruzarse y de este modo solidificar (sólido)
 4. Se añadió la suspensión del micro tumor al reservorio de la matriz
 5. La matriz se incubó durante 7 minutos a 37°C para permitir a las células establecerse en los pocillos individuales de la matriz

20

 6. El medio STEM se eliminó suavemente del reservorio – dejando a los micro tumores en los pocillos
 7. La matriz se cogió del refrigerador (5°C) y se dejó durante 30 minutos para permitir al Pluronic® licuar y a las células establecerse en el fondo de la matriz (fluido)
 8. A continuación la matriz se incubó a 37°C durante 1 hora para permitir al Pluronic® solidificar y fijar las células en una determinada posición (sólido)

25

 9. La matriz con los micro-tumores posicionados en el fondo se visualizaron en un microscopio automático
 10. Se obtuvieron imágenes cada día durante 10 días y se midió el crecimiento (y la inhibición del crecimiento) del micro-tumor mediante cuantificación del área de los micro-tumores.

Ejemplo 6:

Cribado de compuestos embebidos en nano-partículas termo sensibles distribuidas en Matrigel®

30

Materiales y disoluciones:

- Matriz preparada según el Ejemplo 2
 - Medio STEM: DMEM/F12 w. 15% Hepes (Gibco 11330-032), StemPro hESC SFM suplemento de crecimiento (50x):1x
BSA 25%, Gibco A10008-01: 1,8%, FGF-básico (10 ug/ml):8ng/ml, 2-Mercaptoetanol Gibco 21985 (55 mM): 0,1 mM, Penicilina/estreptomicina 200U/ml/200ug/ml (= 2x conc. habitual), Gentamicina Sigma G1272: 1:100: (= 2x conc. habitual), Anfotericina (fungicida): 1:100 (= 1x conc. habitual), Hepes 15 mM
- 35
- Incubadora, 37°C (CO₂, 99% de humedad para cultivo celular)
 - Cabina de calefacción (para proporcionar 42°C)

Procedimiento:

- 40
1. Se preparó el tejido tumoral del paciente para formar una población de pequeños micro-tumores individuales (esferoides)
 2. Los micro-tumores se suspendieron en el medio STEM frío

ES 2 701 339 T3

3. La matriz se cogió directamente del congelador y se colocó en el dispositivo de enfriamiento (sólido)
4. Se añadió la suspensión del micro tumor al reservorio de la matriz
5. La matriz se dejó durante 7 minutos para permitir que las células se distribuyeran y establecieran en los pocillos individuales de la matriz
- 5 6. Se eliminó suavemente el medio STEM del reservorio - dejando a los micro tumores en los pocillos
7. La matriz se cambió al refrigerador (5°C) y se dejó durante 30 minutos para permitir al Matrigel® licuar y que las células se establecieran en el fondo de la matriz (fluido)
8. A continuación la matriz se incubó a 37°C durante 1 hora para permitir al Matrigel® solidificar y fijar a las células en una determinada posición (sólido)
- 10 9. A continuación la matriz se incubó a 42°C durante 12 minutos para liberar los compuestos de las nano-partículas
10. La matriz se incubó durante 30 minutos a 37°C para equilibrar el contenido de la matriz a 37°C
11. La matriz con los micro-tumores posicionados en el fondo se visualizaron en un microscopio automático
12. Se obtuvieron imágenes cada día durante 10 días y se midió el crecimiento (y la inhibición del crecimiento) del micro-tumor mediante cuantificación del área de los micro-tumores.
- 15

En la figura 4 se muestra un ejemplo del crecimiento de un micro-tumor. Se tomaron imágenes bajo el microscopio del crecimiento de los micro-tumores (esferoides) en el día 0, 3, 5 y 7 en la ausencia y presencia de Irinotecán. Como se pudo ver, el Irinotecán inhibe la proliferación de estas células cancerosas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un compuesto o una combinación de compuestos que modifican al menos un fenotipo celular, dicho método comprende las etapas de:
 - 5 i) proporcionar una biblioteca que contiene una pluralidad de miembros de biblioteca, en donde cada miembro de biblioteca es un compuesto o una combinación de compuestos;
 - ii) proporcionar una suspensión de células que puede requerir dicho fenotipo celular;
 - iii) proporcionar un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar de un estado sol a un estado en gel
 - iv) proporcionar una matriz que contiene una pluralidad de espacios
 - 10 v) añadir dicho soporte en estado sol a los espacios de dicha matriz
 - vi) añadir los miembros de biblioteca a los espacios de dicha matriz, en donde se añaden al menos dos miembros de biblioteca diferentes a dos espacios diferentes, en donde las etapas v) y vi) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden,
 - vii) llevar el soporte al estado de gel;
 - 15 viii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células, y
 - ix) llevar el soporte al estado sol en donde las etapas viii) y ix) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden; y
 - x) llevar el soporte al estado de gel atrapando de este modo las células en el soporte; y
 - xi) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el mantenimiento y/o el crecimiento de las células,
 - 20 xii) detectar el fenotipo celular en las células,
 - xiii) identificar los miembros de biblioteca que modifican el fenotipo celular, identificando de ese modo un compuesto o una combinación de compuestos que modifican dicho fenotipo celular.
2. El método según la reivindicación 1, en donde se proporciona más de un tipo de célula.
3. El método según la reivindicación 1, en donde dicho soporte es un gel reversible a la temperatura.
- 25 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho soporte es un sol-gel con una temperatura de transición sol-gel en el intervalo de 0 a 35°C.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el soporte es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en geles gelatinosos y, copolímeros.
- 30 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la matriz es un recipiente que comprende una pluralidad de compartimentos, que están separados mediante barreras físicas.
7. El método según la reivindicación 5, en donde las etapas v) y vi) comprenden añadir el soporte y los miembros de biblioteca a dichos compartimentos o pocillos, en donde al menos se añaden dos miembros de biblioteca diferentes a dos compartimentos o pocillos distintos.
- 35 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la célula son células cancerosas primarias.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fenotipo celular se selecciona del grupo que consiste en la proliferación celular y la muerte celular.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde las células son células cancerosas proporcionadas al menos en parte en la forma de esferoides y el fenotipo celular es el crecimiento in vitro de dichos esferoides.
- 40 11. Un método para identificar un compuesto o una combinación de compuestos que modifica al menos un fenotipo celular, dicho método comprende las etapas de:
 - 45 i) proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de espacios, en donde cada espacio comprende un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar del estado sol al estado en gel; y en donde al menos 2 espacios comprenden además diferentes

miembros de biblioteca; y en donde cada miembro de biblioteca es un compuesto o una combinación de compuestos, y en donde el soporte está en el estado de gel;

- ii) proporcionar una suspensión de células que puede adquirir dicho fenotipo celular;
- iii) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células; y
- 5 iv) llevar el soporte al estado sol en donde las etapas ii) y iii) se puede realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden;
- v) llevar el soporte al estado de gel atrapando de este modo las células en el soporte; y
- vi) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el mantenimiento y/o el crecimiento de las células;
- vii) detectar el fenotipo celular en las células,
- 10 viii) identificar los miembros de la biblioteca que modifican el fenotipo celular, identificando de este modo un compuesto o una combinación de compuestos que modifican dicho fenotipo celular.

12. Un método para predecir la eficacia del tratamiento de una afección clínica con cada uno de la pluralidad de miembros de biblioteca en un individuo que padece de dicha afección clínica, en donde la afección clínica se caracteriza por al menos un fenotipo celular, y en donde cada miembro de biblioteca es un compuesto o una combinación de compuestos, dicho método comprende las etapas de:

- i) proporcionar una muestra que comprende células asociadas con dicha afección clínica a partir de un individuo que padece de dicha afección clínica,
- ii) determinar si dichos miembros de biblioteca modifican dicho fenotipo celular mediante la realización del método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la modificación del fenotipo celular mediante los miembros de biblioteca es indicativo de la eficacia del tratamiento de la afección clínica en dicho individuo.

13. El método según la reivindicación 12 en donde las células son causantes de dicha afección clínica.

14. El método según la reivindicación 12 en donde la afección clínica es el cáncer.

15. El método según la reivindicación 12 en donde uno o más miembros de biblioteca son fármacos útiles en el tratamiento del cáncer o una combinación de fármacos útiles en el tratamiento del cáncer.

16. El método según la reivindicación 12 en donde el método es un método para predecir la eficacia del tratamiento de un cáncer en un individuo que necesita del mismo, el método comprende las etapas de:

- i) proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de espacios, en donde cada espacio comprende un soporte compatible con las células, en donde el soporte reversible puede cambiar del estado sol al estado en gel; y en donde al menos 2 espacios comprenden además diferentes miembros de biblioteca; y en donde cada miembro de biblioteca es un fármaco o una combinación de fármacos útiles en el tratamiento del cáncer, y en donde el soporte está en el estado de gel;
- ii) proporcionar una suspensión de células cancerosas o células cancerosas en esferoides obtenidos a partir de dicho individuo;
- 35 iii) llevar el soporte al estado de gel; y
- iv) poner en contacto los espacios de dicha matriz con la suspensión de células; y
- v) llevar el soporte al estado sol en donde las etapas iv) y v) se pueden realizar simultánea o secuencialmente en cualquier orden; y
- vi) llevar al soporte al estado de gel atrapando de este modo a las células en el soporte; y
- 40 vii) incubar la matriz bajo condiciones que permitan el crecimiento de las células detectar el fenotipo celular en las células,
- viii) detectar la proliferación de células cancerosas y/o el crecimiento de esferoides de células cancerosas,
- 45 ix) identificar los miembros de biblioteca que inhiben la proliferación de células cancerosas y/o el crecimiento de esferoides de células cancerosas, en donde los miembros de biblioteca que inhiben la proliferación de las células cancerosas y/o el crecimiento de esferoides de células cancerosas, se predicen por ser eficaces en el tratamiento del cáncer en dicho individuo.

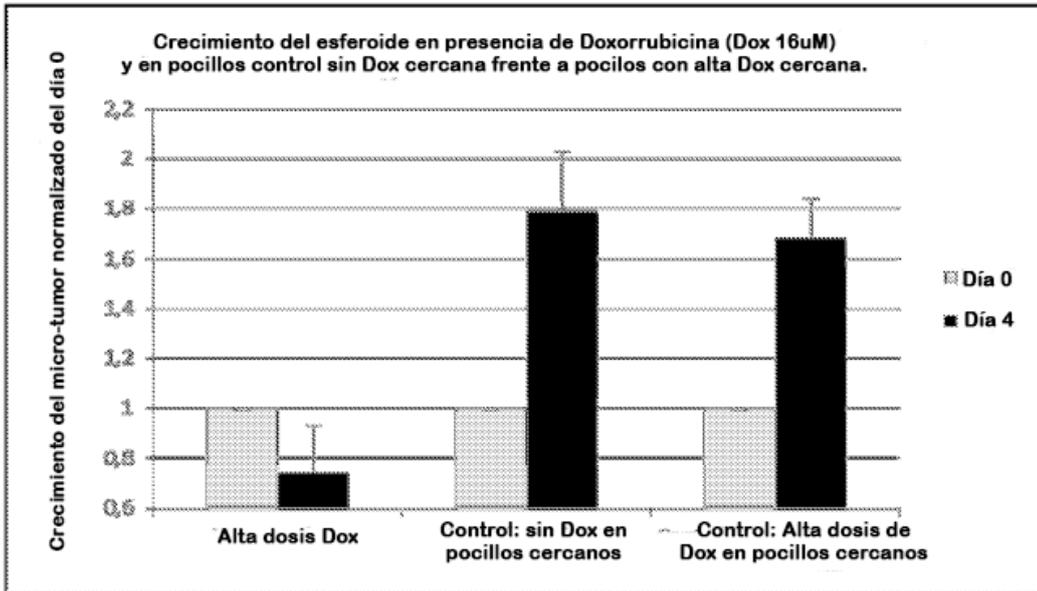
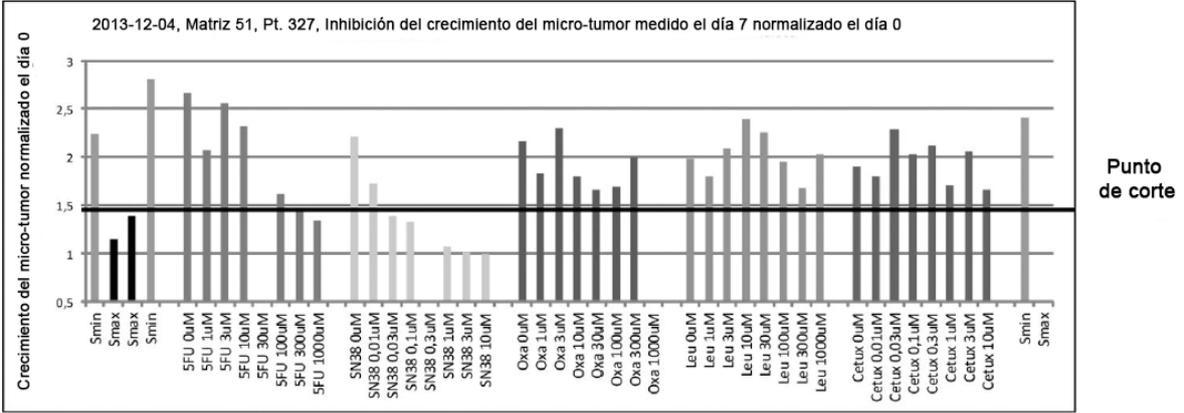


Fig. 1

Cribado de 2 pacientes individuales

Paciente 1: El crecimiento del esteroide se inhibe por 5FU y SN38 pero por Oxaliplatino, Leucovorina y Cetuximab.



Paciente 2: El crecimiento del esteroide se inhibe por 5FU, SN38 y Oxaliplatino pero no por Leucovorina y Cetuximab.

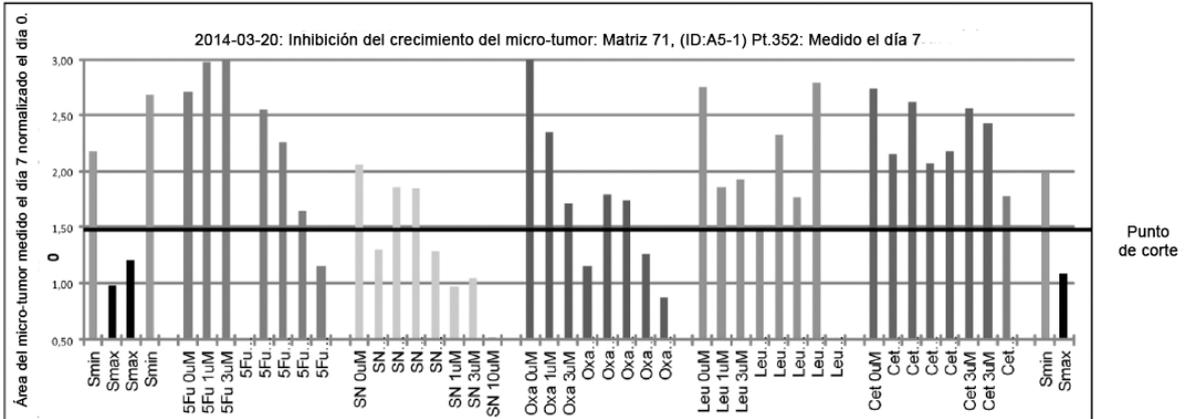


Fig. 2 a

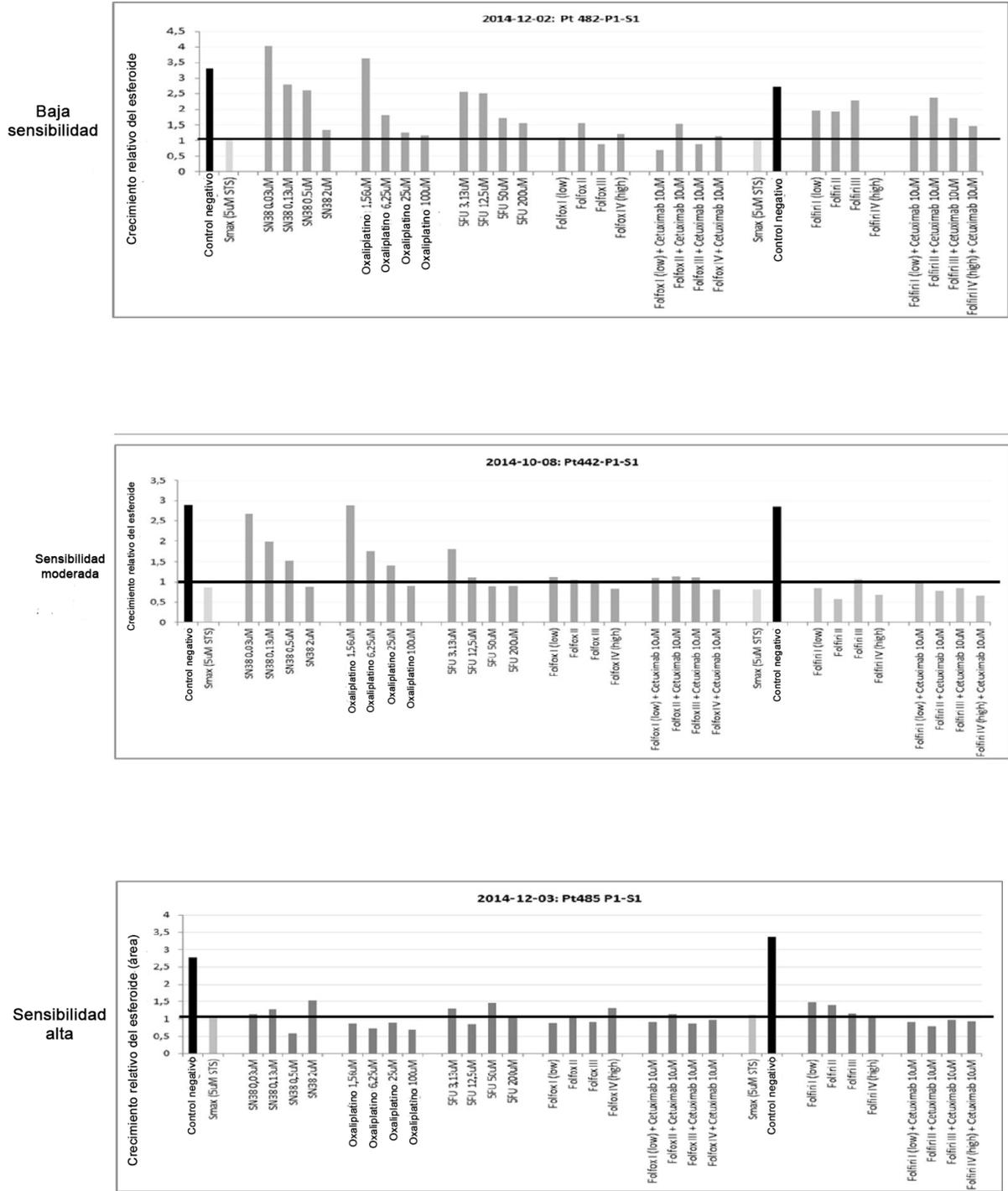


Fig. 2b

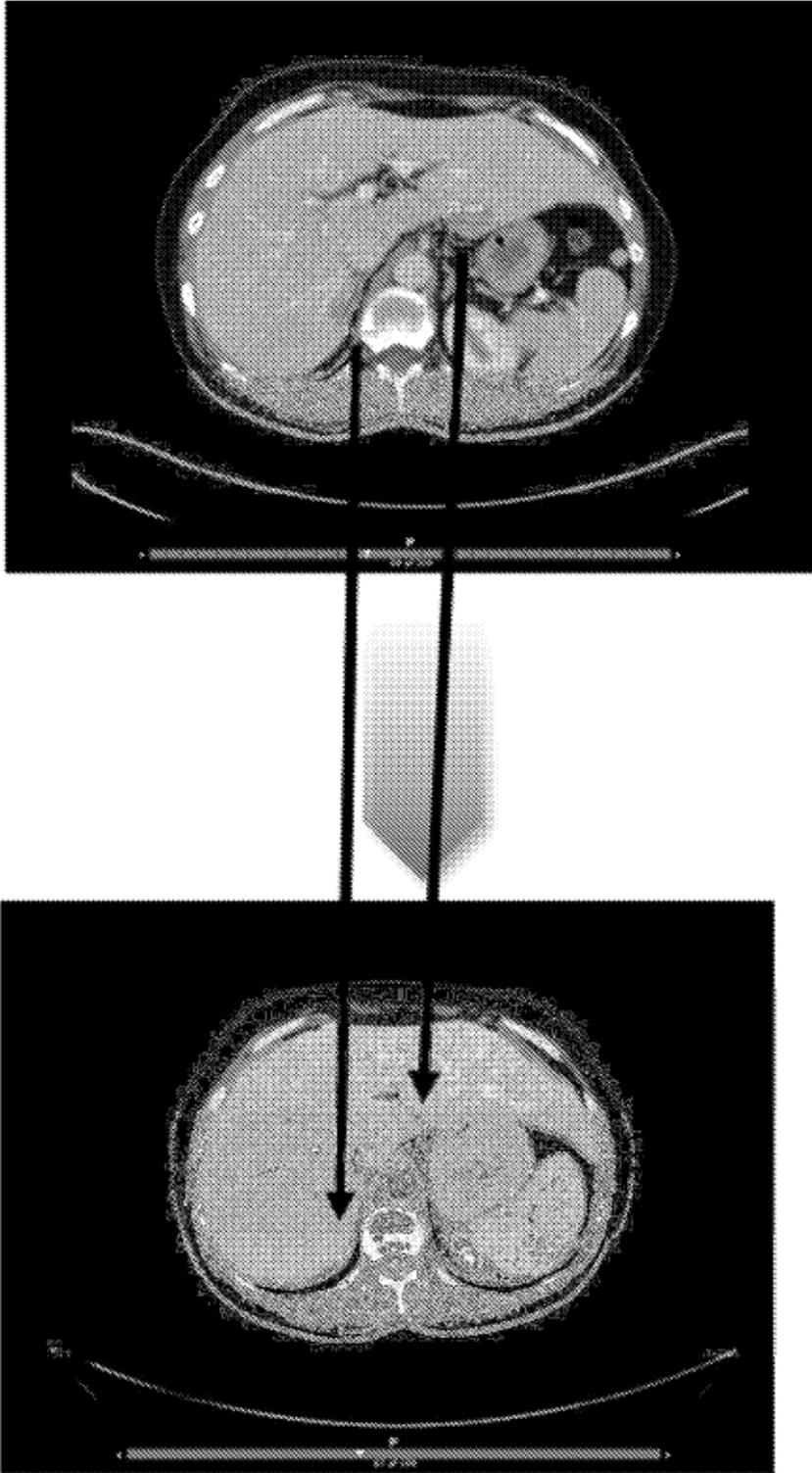


Fig. 2c

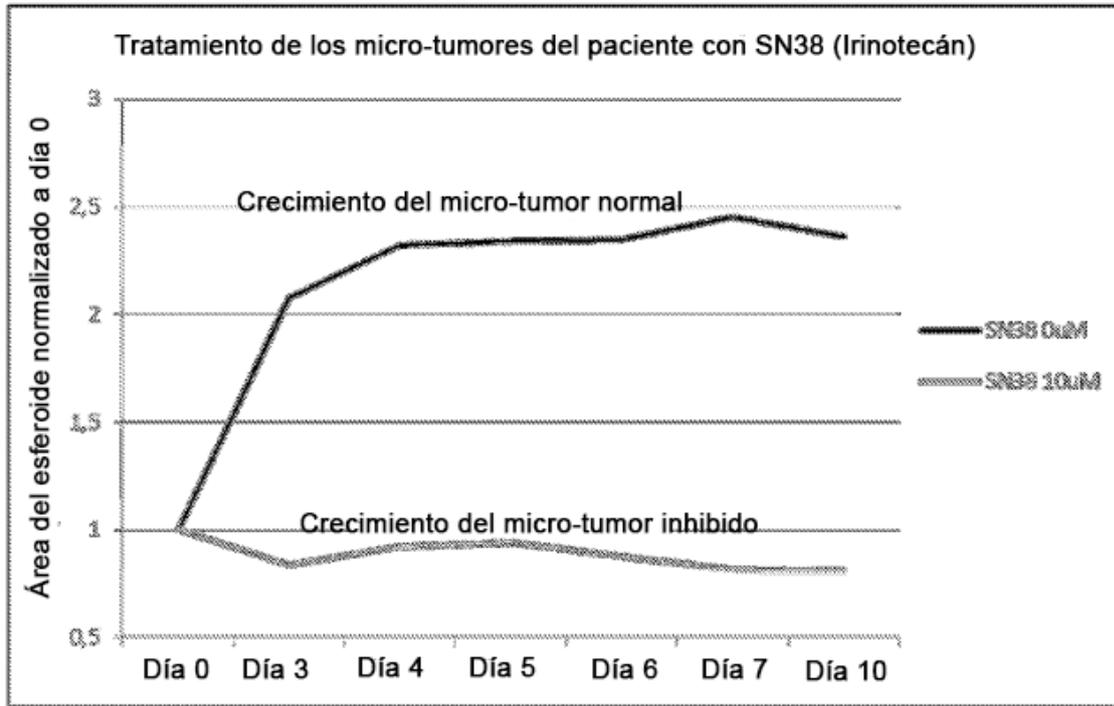
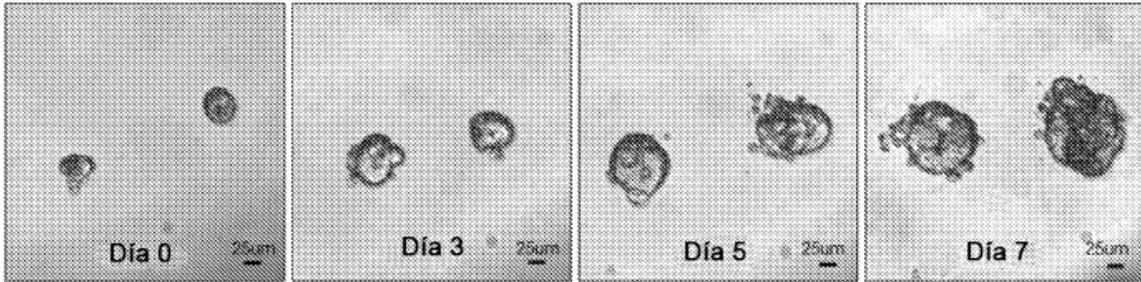


Fig. 3

Crecimiento del micro-tumor en una matriz con un soporte de fase combinante.



Inhibición del crecimiento del micro-tumor en una matriz con un soporte de fase combinante que tiene un compuesto de quimio-terapia (Irinotecán)

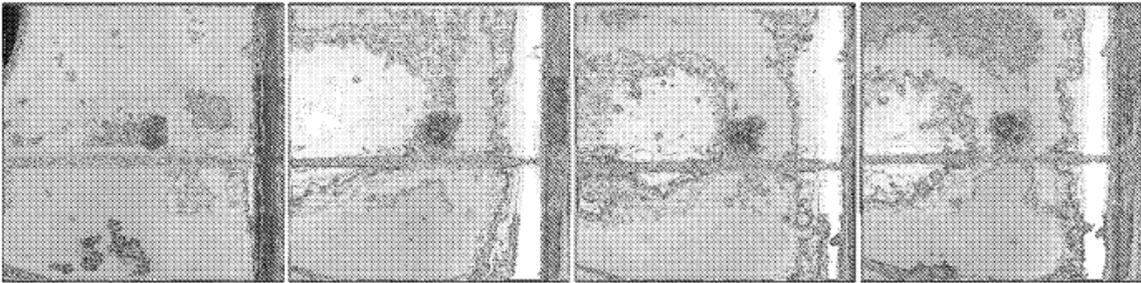


Fig. 4