

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 704**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 27/403 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2005 PCT/EP2005/003662**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2005 WO05098425**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2005 E 05730755 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 1740945**

54 Título: **Sistemas de ensayo tisulares funcionales no invasivos in vitro**

30 Prioridad:

07.04.2004 EP 04008497

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

25.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOHLEN, HERIBERT;
KOLOSSOV, EUGEN;
KETTENHOFEN, RALF;
SCHOLZ, MELANIE y
FINK, LEO**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 701 704 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

Sistemas de ensayo tisulares funcionales no invasivos *in vitro*

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención concierne de forma general a una combinación específica de matrices de electrodos multifuncionales con el sustrato integrado y una tecnología de células madre.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] Las células precursoras han adquirido un interés fundamental en la investigación médica. Muchos tejidos del cuerpo tienen un depósito de reserva de precursores que pueden sustituir las células que son senescentes o están lesionadas por daños o enfermedades. Se ha realizado un considerable esfuerzo recientemente para aislar los precursores de diversos tejidos diferentes para su uso en la medicina regenerativa y el descubrimiento de fármacos. Las fuentes y los sistemas para la producción de células diferenciadas a partir de una población de células madre para su uso siempre que se desee una población de células relativamente homogéneas se ha resumido, por ejemplo, en la solicitud de Patente de Estados Unidos US2003/0040111. Las células madre embrionarias (ME) multi- y pluripotentes, así como las células germinales embrionarias (GE) de ratón pueden ser inducidas a diferenciarse en un cultivo en una diversidad de tipos celulares, incluyendo las células del músculo cardíaco.

[0003] Adicionalmente, la tecnología de células ME se usa en pruebas de toxicidad. Constantemente se están desarrollando nuevos compuestos químicos y se prueban en animales. Además de las sustancias químicas industriales y domésticas, cada año se desarrollan diversas composiciones químicas para su uso como productos farmacéuticos. Las normas relativas a las pruebas de potenciales productos farmacéuticos son promulgadas por la Food and Drug Administration ("FDA"), que actualmente requiere unas completas pruebas de toxicidad, de mutagenicidad y de otros efectos en al menos dos especies antes de que un fármaco candidato pueda entrar en los ensayos clínicos con seres humanos. Solamente las pruebas de toxicidad preclínicas cuestan algunos cientos de miles de dólares. A pesar de esta inmensa inversión, prácticamente un tercio de todos los potenciales productos terapéuticos humanos fracasan en la primera fase de los ensayos clínicos con seres humanos debido a una toxicidad inesperada. Es evidente que los ensayos de cribado toxicológico disponibles habitualmente no detectan todas las toxicidades asociadas con la terapia humana o la exposición a productos químicos en el medio ambiente. Unos mejores medios de cribado de la potencial toxicidad de potenciales productos terapéuticos reducirían el coste y la incertidumbre del desarrollo de nuevos productos terapéuticos y de materiales, por ejemplo, para su uso en dispositivos médicos o en otros dispositivos o bienes a los que los seres humanos están expuestos cada día.

[0004] La detección de las propiedades teratógenas y/o embriotóxicas de los agentes químicos se produce actualmente mediante la determinación de la toxicidad de reproducción de las sustancias de prueba después de unas administraciones individuales o múltiples a mamíferos de laboratorio preñados y mediante pruebas de embriotoxicidad en las etapas tempranas del embarazo. Adicionalmente se realizan pruebas *in vitro* con embriones de mamíferos (Neubert y Merker, de Gruyter, Berlín-Nueva York (1981)) y con órganos embrionarios para pruebas de teratogenia. Sin embargo, estos procedimientos de prueba tienen el inconveniente de que requieren el uso de un gran número de mamíferos vivos, en particular ratas y ratones. Se emplean unos procedimientos de prueba *in vitro* en los que se emplean células de cultivo primario (por ejemplo, "Limb Buds", Kochhar, Teratology 11 (1975), 273-287) o partes del cerebro de ratas embrionarias (Flint y Orton, Toxicol. Appl. Pharmacol. 76 (1984), 383-395) o líneas celulares permanentes de un tejido de mamífero embrionario o adulto, tales como células tumorales del ovario o células de paladar embrionario, que no satisfacen, hablando estrictamente, los requisitos impuestos para las pruebas de teratogenia durante la embriogénesis, a saber, que proporcionen indicaciones de una posible disgenesia o de alteraciones en el desarrollo.

[0005] Durante un par de años se han realizado esfuerzos para emplear sistemas de prueba basados en células *in vitro* para la detección de la toxicidad o de la eficacia de nuevos compuestos farmacéuticos. Esos sistemas dependen de cultivos de células primarias o de líneas celulares permanentes. Los inconvenientes de los cultivos de células primarias incluyen unas laboriosas preparaciones, el consumo de animales y la variación entre animales individuales. Las líneas celulares permanentes frecuentemente no consiguen representar las condiciones fisiológicas.

[0006] Por lo tanto, sigue habiendo siempre la necesidad de ensayos alternativos y preferentemente mejorados.

Por ejemplo, el documento US-A-6.498.018 describe un procedimiento para la determinación del efecto de un agente biológico que pone en contacto un cultivo celular con un agente etiológico. El cultivo celular contiene células madre neurales del SNC multipotentes humanas que derivan de tejido neural primario del SNC y un medio de cultivo con unos factores de crecimiento preseleccionados. La lectura se proporciona por el efecto de un agente biológico sobre la presencia o la ausencia de una función biológica o de una propiedad atribuible al cultivo celular. Un

importante inconveniente de este sistema es el hecho de que las funciones o las propiedades biológicas en particular inherentes a un cierto cultivo de células son difíciles de medir, y a menudo implican la destrucción de una gran parte del cultivo con objeto de obtener material suficiente para el ensayo.

5 **[0007]** El documento WO02/086073 describe un procedimiento para la selección positiva de células neuronales diferenciadas a partir de células madre embrionarias de transferencia nuclear aprovechando la nectina marcadora de la célula madre neural. Este procedimiento está limitado a los tipos celulares neurales que expresan de forma natural la nectina. El documento US-A-6.007.993 describe un procedimiento de prueba *in vitro* para la
 10 células madre embrionarias (ME) pluripotentes diferenciadas a partir de ratón y de rata, y usando células germinales embrionarias (GE) obtenidas establecidas a partir de células germinales primordiales. Se construyen clones de células madre ME o GE transgénicos estables, en los que un gen indicador bacteriano LacZ o el gen de la luciferasa se pone bajo el control de promotores específicos tisulares o de genes de control del desarrollo. Después de la diferenciación de las células ME en presencia de sustancias teratógenas en los diferentes derivados de la vía de
 15 germinación, se produce una expresión dependiente de la diferenciación en las células, debida a la actividad de los promotores específicos tisulares. La activación, la represión o la modulación de estos genes específicos tisulares se detecta basándose en una reacción que depende del gen indicador empleado, por ejemplo, el ensayo de X-Gal.

[0008] El documento WO99/01552 describe células madre embrionarias (ME) que se transfectan de una
 20 forma estable con una construcción de ADN que codifica una proteína fluorescente que no daña a la célula y, unido operativamente a la misma, un promotor dependiente de la célula o del desarrollo. También se describe un procedimiento para la monitorización toxicológica de sustancias mediante el uso de estos cultivos de células ME.

[0009] El documento WO 2005/005662 A es un documento de la técnica anterior conforme al Art. 54(3) EPC
 25 y describe procedimientos de monitorización de la diferenciación celular basados en el uso de células madre transgénicas, en el que dichas células madre están caracterizadas por la expresión dependiente de la diferenciación de una proteína indicadora secretada.

[0010] El documento WO 2004/011603 A describe exclusivamente el uso de células madre embrionarias
 30 humanas, en particular de líneas de células madre embrionarias humanas derivadas de embriones humanos sin el uso de un sistema de selección marcador.

[0011] Bremer S. et al., ATLA, ALTERNATIVES TO LABORATORY ANIMALS 1999, vol. 27, nº 3, 1999, páginas 471-484, describe un ensayo de embriotoxicidad que usa células ME transgénicas en el que la expresión de
 35 la GFP es activada a partir de un transgen mediante el promotor temprano de la actina alfa humana específico cardíaco.

[0012] Spielmann H et al., CONGENITAL ANOMALIES, vol. 40, nº Supl. diciembre de 2000 (2000-12), páginas S8-S18 describe una prueba con células ME que usa células ME en las que la expresión de la GFP es
 40 activada a partir de un transgen mediante el promotor temprano de la actina alfa humana específico cardíaco y un análisis de FACS de las células transgénicas.

[0013] Seiler Andrea et al., ALTEX, vol. 19 Supl. 1, 2002, páginas 55-63 describe el uso de marcadores moleculares para la selección de células ME específicas que incluyen la detección de moléculas específicas del
 45 estadio/tipo celular mediante una inmunofluorescencia.

[0014] El documento WO 03/046141 A2 describe la derivación de líneas de células hME a partir de ovocitos activados por partenogénesis.

50 **[0015]** Aunque los procedimientos descritos anteriormente emplean unos ensayos semicuantitativos, así como relativamente simples y robustos, esos ensayos habitualmente están limitados por unas poblaciones de células no homogéneas y unos procedimientos de detección pobres.

[0016] Por lo tanto, existe una necesidad de sistemas de ensayo *in vitro* basados en células que
 55 proporcionen unos resultados fiables. La solución a dicho problema técnico se consigue proporcionando las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones, y descritas adicionalmente a continuación.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

60 **[0017]** La presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo tisular y celular funcional *in vitro* para la obtención y/o la caracterización de un compuesto de interés, por ejemplo, un fármaco, según se caracteriza con detalle en la reivindicación 1, que comprende:

- (a) cultivar un material biológico que comprende células, un agregado de células, un tejido o un órgano en una
 65 matriz de electrodos;
 (b) someter dicho material biológico a una sustancia de prueba; y

(c) medir la actividad eléctrica de dicho material biológico a través de dicha matriz de electrodos, y analizar uno cualquiera o todos los parámetros según se especifica en la reivindicación 1.

[0018] Este procedimiento se lleva a cabo preferentemente con una multi- o micromatriz de electrodos (MEA).

5 Este sistema de ensayo de la presente invención es una ventajosa alternativa en particular a las pruebas con animales para los análisis de los efectos cardíacos, que habitualmente son bastante largos y caros. Por lo tanto, el sistema de ensayo funcional tisular es particularmente útil en el desarrollo de fármacos y en las pruebas de toxicidad de cualquier compuesto con el que pudiera entrar en contacto un ser humano o un animal. Una forma de realización preferida en particular del sistema de ensayo funcional tisular de la presente invención emplea los denominados
10 cardiocuerpos, es decir, cuerpos embrioides (CE) diferenciados en cardiomiocitos y que representan un tejido cardíaco funcional que consiste en cardiomiocitos atriales y ventriculares, así como las células de marcapasos.

[0019] En particular, la presente invención proporciona una nueva tecnología que reside en la combinación del registro extracelular de los procesos electrofisiológicos a través de micromatrices de electrodos multifuncionales integradas en el sustrato (M-MEA) con electrodos de pH, electrodos de pO₂ y electrodos para el registro extracelular
15 del potencial de campo de los procesos electrofisiológicos, los análisis ópticos digitales y la tecnología de células madre embrionarias (células ME).

[0020] Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de kits y de aparatos útiles para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención, pudiendo comprender dichos kits, vectores o composiciones de vectores, matrices, células multi- o pluripotentes; y opcionalmente un medio de cultivo, moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, compuestos patrones, etc.
20

[0021] Otras formas de realización de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción.
25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0022]

30 **Figura 1:** chip que se va a usar en el sistema de ensayo de la presente invención. Un chip que se va a usar según un sistema de ensayo de la presente invención puede derivar de las micromatrices de electrodos disponibles comercialmente, tales como las descritas adicionalmente a continuación y en los ejemplos. La parte óptica del chip comprende habitualmente un chip fotográfico, sobre el cual se construyen las áreas de cultivo con la ayuda de conductores de luz o de fibras ópticas, y que sirve para el registro de las secuencias de video, que pueden ser
35 almacenadas en un ordenador y analizadas.

DEFINICIONES

[0023] Para los propósitos de esta descripción, el término "célula madre" puede referirse a una célula madre o a una célula germinal, por ejemplo, a madre embrionarias (ME) y germinales (GE), respectivamente. Mínimamente, una célula madre tiene la capacidad de proliferar y de formar células de más de un fenotipo diferente, y también es capaz de autorrenovarse, ya sea como parte del mismo cultivo o cuando se cultiva en unas condiciones diferentes. Las células madre embrionarias también son normalmente positivas para la telomerasa y positivas para el OCT-4. La actividad de la telomerasa puede ser determinada mediante el uso del ensayo de actividad TRAP (Kim et al.,
45 Science 266 (1997), 2011), usando un kit disponible comercialmente (TRAPeze(R) XK Telomerasa Detection Kit, Cat. s7707; Intergen Co., Purchase N. Y.; o TeloTAGGG(TM) Telomerase PCR ELISAplus, Cat. 2.013.89; Roche Diagnostics, Indianapolis). La expresión hTERT también puede ser evaluada a nivel del ARNm mediante una RT-PCR. El kit de cuantificación de hTERT LightCycler TeloT-AGGG(TM) (Cat. 3.012.344; Roche Diagnostics) está disponible comercialmente con fines de investigación.
50

[0024] Para el propósito de esta descripción, el término madre embrionarias (ME) puede incluir cualquier célula madre multi- o pluripotente derivada de tejido pre-embrionario, embrionario o fetal en cualquier momento después de la fertilización, y tienen la característica de ser capaces, en unas condiciones apropiadas, de producir una progenie de numerosos tipos celulares diferentes que derivan de la totalidad de las tres capas germinales
55 (endodermo, mesodermo y ectodermo), según una prueba convencional aceptada en la técnica, tal como la capacidad para formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de edad. Las "células germinales embrionarias" o "células GE" son células derivadas de las células germinales primordiales. El término "célula germinal embrionaria" se usa para describir las células de la presente invención que muestran un fenotipo de célula pluripotente embrionaria. Los términos "célula germinal embrionaria humana (GE)" o "célula germinal embrionaria" pueden usarse de forma intercambiable en este documento para describir células de mamífero, preferentemente humanas, o líneas celulares de las mismas, que muestran un fenotipo de célula madre embrionaria pluripotente según se define en este documento. Por lo tanto, las células GE son capaces de diferenciarse en células de las capas germinales ectodérmica, endodérmica y mesodérmica. Las células GE también pueden caracterizarse por la presencia o la ausencia de los marcadores asociados con unos sitios de epítipo
60 específicos identificados por la unión de unos anticuerpos en particular y por la ausencia de ciertos marcadores según se identifica por la ausencia de la unión a ciertos anticuerpos.
65

- [0025]** "Pluripotente" se refiere a células que conservan el potencial de desarrollo para diferenciarse en una amplia variedad de estirpes celulares, incluyendo la línea germinal. Los términos "fenotipo de célula madre embrionaria" y "células de tipo madre embrionarias" también se usan de forma intercambiable en este documento para describir las células que no están diferenciadas, y por lo tanto son células pluripotentes y que preferentemente son susceptibles de distinguirse visualmente de otras células adultas del mismo animal.
- [0026]** En la definición de células ME están incluidas las células embrionarias de varios tipos, ejemplificadas únicamente mediante la referencia a las células madre embrionarias humanas, descritas por Thomson et al. (Science 282 (1998), 1145); las células madre embrionarias de otros primates, tales como las células madre Rhesus (Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92 (1995), 7844), las células madre de tití (Thomson et al., Biol. Reprod. 55 (1996), 254) y las células germinales embrionarias humanas (GEh) (Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95 (1998), 13726). En el término también están incluidos otros tipos de células pluripotentes. Está incluida cualquier célula de origen mamífero que sea capaz de producir una progenie que derive en la totalidad de las tres capas germinales, independientemente de si derivaban de un tejido embrionario, de un tejido fetal o de otras fuentes. Las células madre empleadas según la presente invención son preferentemente (aunque no siempre necesariamente) cariotípicamente normales. Sin embargo, se prefiere no usar células ME que deriven de una fuente maligna.
- [0027]** Las "células alimentadoras" o "alimentadoras" son términos usados para describir las células de un tipo que se cultivan conjuntamente con células de otro tipo, para proporcionar un entorno en el que las células del segundo tipo pueden crecer. Las células alimentadoras son opcionalmente de una especie diferente a la de las células a las que alimentan. Por ejemplo, ciertos tipos de células ME pueden ser alimentados por fibroblastos embrionarios primarios de ratón, fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (tales como células STO murinas, por ejemplo, Martin y Evans, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 72 (1975), 1441-1445) o células de tipo fibroblastos humanos diferenciadas a partir de células ME humanas, según se describe más tarde en esta descripción. El término "célula STO" se refiere a las células de fibroblastos embrionarios de ratón tales como las que están disponibles en el mercado, e incluyen las depositadas como las ATCC CRL-1503.
- [0028]** El término "cuerpos embrioides" (CE) es un término de la técnica sinónimo de "cuerpos agregados". Los términos se refieren a agregados de células diferenciadas y no diferenciadas que aparecen cuando las células ME crecen excesivamente en cultivos monocapa, o se mantienen en cultivos en suspensión. Los cuerpos embrioides son una mezcla de diferentes tipos celulares, normalmente procedentes de diversas capas germinales, que se distingue por criterios morfológicos; véase también *infra*. Según se usa en el presente documento, "cuerpo embrioides", "CE" o "células CE" normalmente se refiere a una estructura morfológica formada por una población de células, la mayoría de las cuales deriva de células madre embrionarias (ME) que han experimentado una diferenciación. En unas condiciones de cultivo adecuadas para la formación de CE (por ejemplo, la eliminación del factor inhibidor de la leucemia o de otros factores de bloqueo similares), las células ME proliferan y forman pequeñas masas de células que comienzan a diferenciarse. En la primera fase de la diferenciación, que habitualmente se corresponde con aproximadamente los días 1-4 de la diferenciación para los seres humanos, la pequeña masa de células forma una capa de células endodérmicas en la capa externa, y se considera un "cuerpo embrioides simple". En la segunda fase, que habitualmente se corresponde aproximadamente con los días 3-20 posteriores a la diferenciación para los seres humanos, se forman los "cuerpos embrioides complejos", que están caracterizados por una amplia diferenciación de las células ectodérmicas y mesodérmicas y de los tejidos derivados. Según se usa en el presente documento, el término "cuerpo embrioides" o "CE" engloba los cuerpos embrioides tanto simples como complejos, salvo que el contexto lo requiera de otro modo. La determinación de cuándo se han formado los cuerpos embrioides en un cultivo de células la realizan de forma rutinaria las personas expertas en la materia, por ejemplo, mediante una inspección visual de la morfología. Las masas flotantes de aproximadamente 20 células o más se consideran cuerpos embrioides; véase, por ejemplo, Schmitt et al., Genes Dev. 5 (1991), 728-740; Doetschman et al. J. Embryol. Exp. Morph. 87 (1985), 27-45. También se entiende que el término "cuerpo embrioides", "CE" o "células CE" según se usa en este documento, englobe una población de células, la mayoría de las cuales son células pluripotentes capaces de desarrollarse en diferentes estirpes celulares cuando se cultivan en las condiciones apropiadas. Según se usa en el presente documento, el término también se refiere a las estructuras equivalentes derivadas de las células germinales primordiales, que son células primitivas extraídas de regiones gonadales embrionarias; véase, por ejemplo, Shamblott, et al. (1998), *supra*. Cuando las células germinales primordiales, en ocasiones denominadas también en la materia células GE o células germinales embrionarias, se tratan con los factores apropiados, forman células ME pluripotentes a partir de las cuales pueden derivar los cuerpos embrioides; véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos USA-5.670.372; Shamblott, et al., *supra*.
- [0029]** Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se refieren a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud. Están incluidos los genes y los fragmentos de genes, el ARNm, el ARNt, el ARNr, las ribozimas, el ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN y ARN aislados, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Según se usa en esta divulgación, el término polinucleótidos se refiere de forma intercambiable a moléculas bi- y monocatenarias. Salvo que se especifique o se requiera de otro modo, cualquier forma de realización de la invención que sea un polinucleótido engloba tanto una forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se sabe o se predice que componen la

forma bicatenaria. Están incluidos los análogos de ácidos nucleicos tales como los fosporamidatos y los tiofosporamidatos.

[0030] Se dice que una célula está "alterada genéticamente", "transfectada" o "transformada genéticamente" cuando se ha transferido un polinucleótido a la célula mediante cualquier medio adecuado de manipulación artificial, o cuando la célula es la progenie de una célula originalmente alterada que ha heredado el polinucleótido. El polinucleótido comprenderá a menudo una secuencia transcribible que codifica una proteína de interés, que permite que la célula exprese la proteína a un elevado nivel. Se dice que la alteración genética es "heredable" si la progenie de la célula alterada tiene la misma alteración.

[0031] Una "secuencia reguladora" o "secuencia de control" es una secuencia de nucleótidos implicada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, tal como la replicación, la duplicación, la transcripción, el ajuste, la poliadenilación, la traducción o la degradación del polinucleótido. Algunos elementos de control de la transcripción incluyen promotores, potenciadores y represores.

[0032] Las secuencias génicas en particular denominadas promotores, como el promotor "αMHC" o del "colágeno", son secuencias de polinucleótidos derivadas del gen indicado que promueven la transcripción de un producto de la expresión génica unido operativamente. Se reconoce que varias porciones de la secuencia génica no traducida secuencia arriba y del intrón pueden, en algunas circunstancias, contribuir a la actividad del promotor, y que todas, o cualquier subconjunto de estas porciones, pueden estar presentes en la construcción modificada genéticamente indicada. El promotor puede estar basado en la secuencia génica de cualquier especie que tenga el gen, salvo que éste explícitamente restringido, y puede incorporar cualquier adición, sustitución o delección deseable, al igual que la capacidad para promover la transcripción en el tejido objetivo. Las construcciones genéticas diseñadas para el tratamiento de seres humanos normalmente comprenden un segmento que es idéntico en al menos el 90 % a la secuencia de un promotor de un gen humano.

[0033] Según la presente invención, el término "promotor dependiente de la célula y/o del desarrollo" pretende indicar un promotor que muestra su actividad promotora únicamente en unos tipos celulares en particular y/o únicamente en unos estadios del desarrollo celular en particular, tanto en cultivos celulares (cuerpos embrioides) como en mamíferos no humanos transgénicos derivados de las células ME según la invención. Además, puede emplearse cualquier otro promotor específico celular conocido, por ejemplo, para las células nerviosas, las células cardíacas, las neuronas, las células gliales, las células hematopoyéticas, las células endoteliales, las células de músculo liso, las células de músculo esquelético, las células de cartílago, los fibroblastos y las células epiteliales.

[0034] Se dice que los elementos genéticos están "unidos operativamente" si están en una relación estructural tal que les permite operar de una forma según su función esperada. Por ejemplo, si un promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante, puede decirse que la secuencia codificante está unida operativamente al (o bajo el control del) promotor. Puede haber una secuencia interviniente entre el promotor y la región codificante, siempre que se mantenga esta relación funcional.

[0035] En el contexto de secuencias codificantes, promotores y otros elementos genéticos, el término "heterólogo" indica que el elemento deriva de una entidad genotípicamente distinta con respecto al resto de las entidades con las que se está comparando. Por ejemplo, se dice que un promotor o gen introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un animal de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un elemento genético "endógeno" es un elemento que está en el mismo lugar del cromosoma en el que aparece en la naturaleza, aunque pueden introducirse artificialmente otros elementos en una posición vecina.

[0036] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en esta descripción para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede comprender aminoácidos modificados, puede ser lineal o ramificado y puede estar interrumpido por no aminoácidos.

[0037] Si no se establece de otro modo, los términos "compuesto", "sustancia" y "composición (química)" se usan de forma intercambiable en este documento e incluyen, pero no se limitan a, agentes terapéuticos (o potenciales agentes terapéuticos), aditivos alimentarios y nutraceúticos, agentes con una toxicidad conocida tales como neurotoxinas, toxinas hepáticas, toxinas de células hematopoyéticas, miotoxinas, carcinógenos, teratógenos o toxinas contra uno o más órganos reproductores. Las composiciones químicas pueden ser adicionalmente compuestos químicos agrícolas, tales como pesticidas, fungicidas, nematocidas y fertilizantes, productos cosméticos, incluyendo los denominados "cosmeceúticos", residuos o subproductos industriales, o contaminantes medioambientales. También pueden ser productos terapéuticos para animales o potenciales productos terapéuticos para animales. Los productos industriales que pueden ser probados con los procedimientos de la presente invención incluyen lejías, inodoros, bloques, líquidos de lavado, jabón en polvo y líquido, suavizantes de tejidos, limpiadores de ventanas, de hornos, de suelos, de baños, de cocinas y de alfombras, detergentes para lavavajillas y coadyuvantes del aclarado, agentes de ablandamiento del agua, descalcificadores, antimanchas, abrillantadores, productos oleosos, pinturas, eliminadores de pintura, colas, disolventes, barnices, ambientadores, bolas antipolillas e insecticidas.

[0038] Constantemente se están desarrollando nuevos ingredientes para productos domésticos y necesitan ser probados. Por ejemplo, en los últimos años se han desarrollado nuevas enzimas (para digerir las manchas) y "abrillantadores ópticos" (que hacen que la ropa lavada parezca más blanca) para su uso en los polvos y líquidos de lavado. Se han desarrollado nuevos tensioactivos (que atraviesan la grasa para eliminar la suciedad incrustada) y "aditivos" químicos (que actúan como ablandadores del agua y permiten que los tensioactivos trabajen más eficazmente) para su uso en los polvos y líquidos de lavado, líquidos para lavavajillas y diversos agentes de limpieza. Pero también tienen que probarse materiales médicos, por ejemplo, materiales dentales tales como nuevos polímeros de relleno, aleaciones metálicas y cerámicas bioactivas. Adicionalmente, las composiciones químicas de cualquier parte de un dispositivo, tales como catéteres, electrodos, adhesivos, pasta, gel o crema, pueden ser probadas con el procedimiento de la presente invención en diferentes concentraciones y con diferentes ingredientes e impurezas presentes.

[0039] Según se usa en el presente documento, la "caracterización" de una composición química o de un compuesto se refiere a un patrón de alteraciones en el gen o en la expresión de la proteína, o en ambos, o en las propiedades fisiológicas de una célula ME, de un cuerpo embrioide, de un tejido, etc. que ha entrado en contacto con la composición química en comparación con una célula, un cuerpo embrioide o un tejido similar en contacto únicamente con el medio de cultivo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

[0040] La presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo tisular y celular funcional *in vitro* para la obtención y/o la caracterización de un compuesto de interés tal como un fármaco, según se caracteriza con detalle en la reivindicación 1, que comprende:

- (a) cultivar un material biológico que comprende células, un agregado de células, un tejido o un órgano derivado de células madre, preferentemente de células madre embrionarias, en una matriz de electrodos;
- (b) someter dicho material biológico a una sustancia de prueba; y
- (c) medir la actividad eléctrica de dicho material biológico a través de dicha matriz de electrodos, y analizar uno cualquiera o todos los parámetros según se especifica en la reivindicación 1.

[0041] Preferiblemente, el material biológico deriva de un tejido o de estructuras de tipo tisular obtenidos mediante el cultivo de una célula madre embrionarias (ME) derivada del primer tipo celular en presencia de al menos un segundo tipo celular embrionario; y permitir la integración y la alineación de dichos al menos dos tipos celulares en el tejido o en las estructuras de tipo tisular. Un procedimiento correspondiente para proporcionar una diversidad de tejidos y de estructuras de tipo tisular y materiales biológicos similares se describe con detalle en la solicitud internacional WO2004/113515, que es un documento de la técnica anterior conforme al Art. 54(3) EPC. En una forma de realización, el material biológico deriva de células madre no humanas.

[0042] La invención puede llevarse a la práctica mediante el uso de células madre de cualquier especie de vertebrado. Se incluyen las células madre de seres humanos; así como de primates no humanos, animales domésticos, ganado y otros mamíferos no humanos. Entre las células madre adecuadas para su uso en esta invención están las células madre pluripotentes de primates no humanos derivadas de un tejido formado después de la gestación, tales como un blastocito o tejido fetal o embrionario tomado en cualquier momento durante la gestación. Algunos ejemplos no limitantes son cultivos primarios con líneas establecidas de células madre embrionarias. La invención también es aplicable a las células madre adultas. Se hace referencia a la bibliografía de Anderson et al., Nat. Med. 7 (2001), 393-395 y Prockop, Science 276 (1997), 71-74, en los que se describe la extracción y el cultivo de esas células.

[0043] Los medios para aislar y propagar las células madre pueden tener cualquiera de numerosas formulas diferentes siempre que permita que las células obtenidas tengan las características deseadas y que puedan ser propagadas adicionalmente. Algunas fuentes adecuadas incluyen el medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), Gibco, #12440-053; el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco #11965-092; el medio de Eagle modificado por Dulbecco inactivado (KO DMEM), Gibco #10829-018; L-glutamina 200 mM, Gibco # 15039-027; una solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050; [beta]-mercaptoetanol, Sigma # M7522; el factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF), Gibco # 13256-029. Algunos ejemplos de medios para ME que contienen suero y de condiciones para el cultivo de células madre son conocidos y pueden ser optimizados apropiadamente según el tipo celular. Los medios y las técnicas de cultivo para los tipos celulares en particular indicados en la sección previa se proporcionan en las referencias mencionadas en este documento.

[0044] Como se ha indicado anteriormente, hay muchas fuentes de células ME a la disposición de la persona experta, entre las cuales se prefieren las células madre humanas para la mayoría de las formas de realización de la presente invención. Las células madre embrionarias humanas y su uso para la preparación de diferentes tipos de células y tejidos también se describen en Reprod. Biomed. Online 4 (2002), 58-63. Las células madre embrionarias pueden ser aisladas a partir de blastocitos de miembros de especies de primates no humanos (Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92 (1995), 7844).

[0045] Recientemente se ha notificado que los dientes de leche humanos exfoliados, un tejido comparable muy accesible, contienen células madre multipotentes que fueron identificadas como una población de células clonogénicas muy proliferativas capaces de diferenciarse en una diversidad de tipos celulares que incluyen células neurales, adipocitos y odontoblastos; véase Miura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 100 (2003), 5807-5812.

5 Después de un trasplante *in vivo*, se averiguó que esas células eran capaces de inducir la formación de hueso, de generar dentina y de sobrevivir en el cerebro de ratón junto con la expresión de marcadores neurales. Adicionalmente, el potencial multiestirpe de las células madre homocigotas derivadas de los ovocitos en metafase II ha sido descrito por Lin et al. en Stem Cells 21 (2003), 152-161. Varias fuentes de células precursoras en músculos postnatales y los factores que pueden aumentar la participación de las células madre en la formación del nuevo

10 músculo esquelético y cardíaco *in vivo* se revisan en Grounds et al., J. Histochem. Cytochem. 50 (2002), 589-610. La purificación de raras células madre hematopoyéticas (HSC) hasta homogeneidad que residen en la médula ósea se describen el documento US2003/0032185. Se describe que estas células adultas de médula ósea tienen una tremenda capacidad de diferenciación, ya que también pueden diferenciarse en células epiteliales del hígado, del pulmón, del tracto GI y de la piel. El campo de la tecnología de células madre está siendo revisado por Kiessling y

15 Anderson, Harvard Medical School, en Human Embryonic Stem Cells: An Introduction to the Science and Therapeutic Potential; (2003) Jones y Bartlett Publishers; ISBN: 076372341X.

[0046] Las células madre pueden ser propagadas en cultivo de forma continua mediante el uso de una combinación de unas condiciones de cultivo que promuevan la proliferación sin promover la diferenciación.

20 Tradicionalmente, las células madre se cultivan en una capa de células alimentadoras, normalmente células de tipo fibroblasto, derivadas a menudo de tejido embrionario o fetal. Las líneas celulares se colocan en placas hasta casi confluencia, habitualmente se irradian para impedir la proliferación, y después se usan como apoyo cuando se cultivan en un medio condicionado por ciertas células (por ejemplo, Koopman y Cotton, Exp. Cell 154 (1984), 233-242; Smith y Hooper, Devel. Biol. 121 (1987), 1-91), o mediante la adición exógena del factor inhibidor de la

25 leucemia (LIF). Dichas células pueden cultivarse relativamente indefinidamente sin diferenciación mediante el uso de unas condiciones de cultivo adecuadas.

[0047] En ausencia de las células alimentadoras, el factor inhibidor de la leucemia exógeno (LIF) o un medio condicionado, las células ME o GE se diferencian espontáneamente en una gran diversidad de tipos celulares,

30 incluyendo las células que se encuentran en cada una de las capas germinativas endodermo, mesodermo y ectodermo. Con las combinaciones apropiadas de factores de crecimiento y de diferenciación, sin embargo, puede controlarse la diferenciación celular. Por ejemplo, las células ME y GE de ratón pueden generar células de la estirpe hematopoyética *in vitro* (Keller et al., Mol. Cell. Biol. 13 (1993), 473-486; Palacios et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92 (1995), 7530-7534; Rich, Blood 86 (1995), 463-472). Adicionalmente, las células ME de ratón se han usado para

35 generar cultivos de neuronas *in vitro* (Bain et al., Developmental Biology 168 (1995), 342-357; Fraichard et al., J. Cell Science 108 (1995), 3161-3188), cardiomiocitos (las células del músculo cardíaco) (Klug et al., Am. J. Physiol. 269 (1995), H1913-H1921), células del músculo esquelético (Rohwedel et al., Dev. Biol. 164 (1994), 87-101), células vasculares (Wang et al., Development 114 (1992), 303-316), la Patente de Estados Unidos US-A-5.773.255 se refiere líneas de células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a la glucosa, la Patente de Estados

40 Unidos US-A-5.789.246 se refiere a células precursoras de hepatocitos. La diferenciación hepática de células madre embrionarias murinas también se describe en Jones et al., Exp. Cell Res. 272 (2002), 15-22.

[0048] Otros progenitores de interés incluyen, pero no se limitan a, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales del pigmento de la retina, fibroblastos, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas,

45 células del folículo piloso, células epiteliales de los conductos renales, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares y células endoteliales vasculares. Los modelos de diferenciación de células madre embrionarias para la cardiogénesis, la miogénesis, la neurogénesis, la diferenciación de células epiteliales y del músculo liso vascular *in vitro* se han descrito de forma general en Guan et al., Cytotechnology 30 (1999), 211-226.

50 **[0049]** En ciertas formas de realización de la invención, la diferenciación es promovida mediante la retirada de uno o más componentes del medio que promueven el crecimiento de las células indiferenciadas, o que actúan como un inhibidor de la diferenciación. Algunos ejemplos de dichos componentes incluyen ciertos factores de crecimiento, mitógenos, el factor inhibidor de leucocitos (LIF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). La diferenciación también puede ser promovida mediante la adición de un componente al medio que

55 promueva la diferenciación hacia la estirpe celular deseada o que inhiba el crecimiento de las células con unas características no deseadas.

[0050] Según esta invención, las poblaciones de células diferenciadas que se van a usar en el ensayo están preferentemente empobrecidas en células relativamente indiferenciadas y/o en células de los tipos celulares no

60 deseados mediante el uso de un sistema de selección que es letal para las células y los tipos celulares no deseados, es decir, mediante la expresión de un gen marcador seleccionable que hace que las células de un tipo celular específico sean resistentes al efecto letal de un agente externo, bajo el control de una secuencia reguladora que causa que el gen sea expresado preferentemente en el tipo celular deseado y/o en una determinada fase del desarrollo. Para conseguir esto, las células se alteran genéticamente antes del proceso usado para la diferenciación

65 de las células en la estirpe deseada, de una forma tal que las células comprendan un marcador seleccionable unido operativamente a una primera secuencia reguladora específica del tipo celular específico para el primer tipo celular

deseado. Para este propósito puede usarse cualquier vector de expresión adecuado. Los sistemas de vectores víricos adecuados para la producción de células madre alteradas según esta invención pueden prepararse mediante el uso de componentes víricos disponibles comercialmente. La introducción de la construcción o construcciones del vector en las células madre embrionarias se produce de una forma conocida, por ejemplo, mediante una
 5 transfección, una electroporación, una lipofección o con la ayuda de vectores víricos. Los vectores víricos que comprenden genes efectores se describen de forma general en las publicaciones referenciadas en la última sección. Alternativamente, pueden introducirse plásmidos de vector en las células mediante una electroporación, o mediante el uso de complejos de lípidos/ADN. Un ejemplo es la formulación Lipofectamine 2000(TM), disponible en Gibco/Life Technologies. Otro ejemplo de reactivo es FuGENE(TM) 6 Transfection Reagent, una mezcla de lípidos en forma no
 10 liposómica y otros compuestos en etanol el 80 %, obtenible en Roche Diagnostics Corporation. Preferiblemente, se usan las construcciones del vector y los procedimientos de transfección descritos en el documento WO02/051987.

[0051] Los genes de resistencia son conocidos *per se*. Algunos ejemplos de estos son los genes de resistencia a nucleósidos y a antibióticos aminoglucósidos, por ejemplo, a la puomicina (puomicina-N-acetil-transferasa), a la estreptomina, a la neomicina, a la gentamicina o a la higromicina. Algunos ejemplos adicionales
 15 de genes de resistencia son deshidrofolato-reductasa, que confiere resistencia a la aminopterina y el metotrexato, así como genes de resistencia a múltiples fármacos, que confieren una resistencia frente a diversos antibióticos, por ejemplo, frente a vinblastina, doxorubicina y actinomicina D.

[0052] En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, dicho marcador seleccionable confiere resistencia a la puomicina. La puomicina es particularmente adecuada para la eliminación rápida de células no cardíacas en cultivos adherentes de CE transgénicas. Adicionalmente, la selección farmacológica de células cardíacas puede ser implementada en su totalidad en el cultivo en suspensión de las CE transgénicas. Por lo tanto, también podría demostrarse que los cardiomiocitos derivados de ME purificadas
 20 sobreviven mucho más tiempo en un cultivo que los homólogos sin tratar. Además, se ha demostrado que la propia eliminación de las células ME indiferenciadas durante el proceso de selección farmacológico tiene un claro efecto positivo sobre la viabilidad y la longevidad de dichas células derivadas de ME diferenciadas en cardiomiocitos. Además, podría ser sorprendente demostrar que la liberación desde las células circundantes no diferenciadas induce la proliferación de los cardiomiocitos. Por lo tanto, la selección farmacológica posee un efecto tanto
 30 purificador como multiplicador.

[0053] En una forma de realización preferida de la invención, dicha célula ME de dicho primer tipo celular derivado de la célula ME comprende un gen indicador, en la que dicho indicador está unido operativamente a una secuencia reguladora específica del tipo celular específica para dicho primer tipo celular. Este tipo de vector tiene la
 35 ventaja de proporcionar una visualización de la diferenciación, la definición del punto temporal del comienzo de la selección farmacológica, la visualización de la selección farmacológica y el seguimiento del destino de las células purificadas. Dichos vectores, que preferentemente se emplean según los procedimientos de la presente invención, se describen en el documento WO02/051987. Habitualmente, dicha secuencia reguladora específica del tipo celular del gen indicador es sustancialmente la misma que dicha primera secuencia reguladora específica del tipo celular
 40 del gen marcador. Esto puede conseguirse ventajosamente poniendo dicho gen marcador y dicho gen indicador en la misma molécula de ácido nucleico recombinante, es decir, en el vector usado para la transfección de la célula madre, preferentemente de forma que dicho gen marcador y dicho gen indicador estén contenidos en el mismo cistrón.

[0054] El indicador puede ser de cualquier tipo siempre que no dañe la célula y le confiera un fenotipo observable o medible. Según la presente invención, puede usarse la proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* (descrita en el documento WO95/07463, en el documento WO96/27675 y en el documento WO95/21191) y sus derivados "Blue GFP" (Heim et al., Curr. Biol. 6 (1996), 178-182 y Red-shift GFP" (Muldoon et al., Biotechniques 22 (1997), 162-167). Es particularmente preferida la proteína fluorescente verde
 50 mejorada (GEFP). Algunas formas de realización adicionales son las proteínas fluorescente amarilla y cian mejoradas (EYFP y ECFP, respectivamente) y las proteínas fluorescentes rojas (DsRed, HcRed). La persona experta en la materia conoce otras proteínas fluorescentes adicionales y pueden usarse según la invención siempre que no dañen las células. La detección de las proteínas fluorescentes tiene lugar a través de procedimientos de detección de la fluorescencia conocidos *per se*; véase, por ejemplo, Kolossov et al., J. Cell Biol. 143 (1998), 2045-
 55 2056. Como alternativa a las proteínas fluorescentes, particularmente en aplicaciones *in vivo*, también pueden usarse otras proteínas detectables, particularmente los epítomos de esas proteínas. También puede usarse el epítomo de las proteínas, aunque capaz de dañar a la célula *per se*, pero cuyos epítomos no dañen las células; véase también el documento WO02/051987.

[0055] Para la selección de las células ME transfectadas de forma estable, las construcciones de vector contienen un gen marcador seleccionable adicional, que confiere, por ejemplo, resistencia frente a un antibiótico, por ejemplo, neomicina; véase también *supra*. Por supuesto, también pueden usarse otros genes de resistencia conocidos, por ejemplo, los genes de resistencia descritos anteriormente en relación con los genes que codifican la proteína fluorescente. El gen de selección para la selección de las células ME transfectadas de forma estable está
 60 bajo el control de un promotor diferente al que regula el control de la expresión de la proteína detectable. A menudo se usan promotores activos constitutivamente, por ejemplo, el promotor PGK.

[0056] El uso de un segundo gen de selección es ventajoso por la capacidad para identificar los clones no transfectados con éxito (la eficacia es relativamente baja) en absoluto. De otro modo existiría una sofocante mayoría de células ME no transfectadas y durante la diferenciación, por ejemplo, no podrían detectarse las células positivas para la GEFP.

En una forma de realización adicional de la invención, las células pueden ser manipuladas adicionalmente de forma que no se formen tejidos específicos. Esto puede producirse, por ejemplo, mediante la inserción de elementos represores, por ejemplo, un elemento represor inducible por doxiciclina. De este modo, puede excluirse una posible contaminación de las células diferenciadas deseadas por células pluripotentes, potencialmente oncogénicas.

[0057] El primer tipo celular deseado previsto para la diferenciación de la célula madre puede ser de cualquier tipo e incluye, pero no se limita a, células neuronales, células gliales, cardiomiocitos, células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a la glucosa, hepatocitos, astrocitos, oligodendrocitos, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales del pigmento de la retina, fibroblastos, queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales de los conductos renales, células endoteliales vasculares, progenitores testiculares, células del músculo liso y esquelético; véase también *supra*.

[0058] En una forma de realización preferida en particular de la invención, dicho primer tipo celular son cardiomiocitos. Para esta forma de realización, dicha secuencia reguladora específica del tipo celular es preferentemente específica atrial y/o ventricular. Las correspondientes secuencias reguladoras, es decir, los promotores específicos cardíacos, se describen en la técnica anterior; véase también *supra*. Por ejemplo, Nkx-2.5 específico para cardiomiocitos muy tempranos y células precursoras mesodérmicas, respectivamente, (Lints et al., *Development* 119 (1993), 419-431); α -actina cardíaca humana, específica para el tejido cardíaco, (Sartorelli et al., *Genes Dev.* 4 (1990), 1811-1822) y MLC-2V específico para las células del músculo cardíaco ventricular (O'Brien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90 (1993), 5157-5161; Lee et al., *Mol. Cell Biol.* 14 (1994), 1220-1229; Franz et al., *Circ Res.* 73 (1993), 629-638 y el documento WO96/16163). El promotor específico cardíaco de la cadena pesada de la miosina alfa se describe en Palermo et al., *Cell. Mol. Biol. Res.* 41 (1995), 501-519 y en Gulick et al., *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 9180-91855. La expresión de la cadena pesada de la miosina específica atrial AMHC1 y el establecimiento de la polaridad anteroposterior en el corazón de pollo en desarrollo se describe en Yutzey et al., *Development* 120 (1994), 871-883.

[0059] Según esta forma de realización, se prefiere el uso de fibroblastos como dicho al menos un segundo tipo celular embrionario. Esos fibroblastos pueden no derivar necesariamente de embriones, sino que también pueden ser generados *de novo* a partir de células ME según el procedimiento de la presente invención. Por lo tanto, las células ME son transfectadas con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un marcador y opcionalmente un gen indicador unido operativamente a una secuencia reguladora específica del tipo celular, es decir, un promotor específico de fibroblastos tal como el promotor del colágeno $\alpha 2$ (I), aunque también es activo en las células óseas; Lindahl et al., *Biol. Chem.* 277 (2002), 6153-6161; Zheng et al., *Am. J. Pathol.* 160 (2002), 1609-1617; Antoniv et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 21754-21764; véase también Finar et al., *J. Biol. Chem.* 262 (1987), 13323-13333; Bou-Gharios et al., *J. Cell. Biol.* 134 (1996), 1333-1344; Metsaranta et al., *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 16862-16869. Sin embargo, para otras formas de realización también pueden usarse fibroblastos y, o como alternativa, otras células de apoyo tales como células endoteliales, etc. y derivados de las mismas.

[0060] En una forma de realización preferida adicional, el material biológico empleado en el ensayo de la presente invención se obtiene a partir del cultivo de dichos al menos dos tipos celulares en presencia de un tercer tipo celular derivado de una célula embrionaria o madre embrionaria (ME). Dicho tercer tipo celular puede ser cualquier tipo celular mencionado anteriormente. Preferiblemente, dicho tercer tipo celular son células endoteliales. Por lo tanto, pueden usarse tanto células endoteliales embrionarias como células endoteliales derivadas de células ME. En la última forma de realización, dichas células endoteliales derivan de células ME transfectadas con una construcción de vector según se ha descrito anteriormente de forma general, en el que dicha secuencia reguladora específica del tipo celular es un promotor específico endotelial; véase, por ejemplo, el promotor de la cadherina endotelial vascular descrito por Gory et al., *Blood* 93 (1999), 184-192; el promotor/potenciador Tie-2 de Schlaeger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94 (1997), 3058-3063; el promotor/potenciador Flk-1 de Kappel et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000), 1089-1099.

[0061] Se conocen promotores específicos del tipo celular y tisular adicionales; véase, por ejemplo, el fragmento del promotor de la cadena de colágeno (colágeno 2) pro- $\alpha 1$ (II) específico de condrocitos, descrito por Zhou et al., *J. Cell Sci.* 108 (1995), 3677-3684; el promotor específico de la α -1-tubulina neural, descrito en Gloster et al., *J. Neurosci.* 14 (1994), 7319-7330 y el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en Besnard et al., *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 18877-18883. Adicionalmente, véase, por ejemplo, Kawai et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1625 (2003), 246-252 y Kugler et al., *Gene Ther.* 10 (2003), 337-347 para los promotores específicos gliales y neuronales. La eficacia de la formación del cuerpo embriónico y del desarrollo hematopoyético a partir de células madre embrionarias en diferentes sistemas de cultivo se describe, por ejemplo, en Dang et al., *Biotechnol. Bioeng.* 78 (2002), 442-453. "Específico tisular" está incluido en el término "específico celular".

[0062] Algunos ejemplos adicionales de promotores específicos no cardíacos son: PECAM1, FLK-1

(endotelio), la nestina (células precursoras neuronales), el promotor de la tirosina-hidroxilasa-1 (neuronas dopaminérgicas), la α -actina del músculo liso, la miosina del músculo liso (músculos lisos), la α 1-fetoproteína (endoderma), el promotor mínimo SMHC de la cadena pesada del músculo liso (específico de los músculos lisos) (Kallmeier et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 30949-30957).

5

[0063] El término promotor específico del desarrollo se refiere a promotores que son activos durante unos ciertos puntos de tiempo durante el desarrollo. Algunos ejemplos de dichos promotores son el promotor β -MHC, que es expresado durante el desarrollo embrionario en el ventrículo del ratón y es sustituido por el promotor α -MHC en la fase prenatal; el NKx2.5, un promotor durante el desarrollo temprano del mesoderma/corazón; el factor natriurético atrial, un marcador del corazón embrionario temprano, con la excepción del marcapasos, que está regulado por disminución también en etapas posteriores del desarrollo; el Flk-1, un promotor específico del endotelio que es activo durante la vasculogénesis temprana; el segmento 2 del intrón del gen de la nestina, que es expresado en las células precursoras neuronales (las neuronas y las células gliales embrionarias) y en las células gliales adultas (todavía parcialmente capaces de dividirse) (Lotian y Lendahl, Eur. J. Neurosci. 9 (1997), 452-462U).

15

[0064] Para las formas de realización descritas anteriormente en este documento, dicho gen de resistencia y dicho gen indicador están contenidos preferentemente en un vector bicistrónico, y preferentemente están separados por un IRES. Es particularmente preferido el uso de una construcción en la que dicho gen de resistencia confiera resistencia a la puomicina, dicho marcador sea la GFP y dicho promotor sea el promotor cardíaco α MHC.

20

[0065] Como se ha indicado anteriormente, según la presente invención, cualquiera de dichos al menos dos tipos celulares, tales como un tipo celular principal y las correspondientes células de apoyo, pueden derivar de células ME y usarse en el ensayo de la presente invención. Por lo tanto, los tejidos o las estructuras de tipo tejido que se van a ensayar según la presente invención pueden ser obtenidos mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

25

(a) transfectar una o más células multi- o pluripotentes con moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una primera y una segunda secuencia reguladora específica del tipo celular unida operativamente a al menos un marcador seleccionable, en el que dicho segundo tipo celular es diferente de dicho primer tipo celular;

30

(b) cultivar las células en unas condiciones que permitan la diferenciación de las células; y

(c) aislar las células de al menos dos tipos celulares diferenciados y/o eliminar las células no diferenciadas, opcionalmente junto con las células que se diferencian hacia tipos celulares irrelevantes con respecto a los tipos celulares de interés que activan el marcador seleccionable en el transcurso de la diferenciación.

35

De forma análoga, como en los procedimientos previos, se desea la generación de más de dos tipos celulares. Por lo tanto, el procedimiento comprende preferentemente transfectar dicha una o más células con moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que comprenden al menos una secuencia reguladora específica del tipo celular adicional unida operativamente a al menos un marcador seleccionable, en la que dicho al menos un tipo celular adicional es diferente de dicho primer y segundo tipo celular. Para su uso en el procedimiento, dichas moléculas de ácidos nucleicos recombinantes están comprendidas en el mismo vector o en vectores diferentes.

40

[0066] El tipo celular puede seleccionarse entre el grupo que consiste en células neuronales, células gliales, cardiomiocitos, células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a la glucosa, hepatocitos, astrocitos, oligodendrocitos, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales del pigmento de la retina, fibroblastos, queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales de los conductos renales, células endoteliales vasculares, progenitores testiculares, células del músculo liso y esquelético; véase también *supra*.

45

[0067] Los promotores que se usan preferentemente si se desea una preparación de tejido cardíaco mediante la diferenciación de la(s) célula(s) madre(s) transfectada(s) en cardiomiocitos, fibroblastos y opcionalmente células endoteliales, comprenden los descritos anteriormente en este documento. De forma análoga, para la producción de tejido neuronal pueden usarse una o más células madre, por ejemplo, células madre neurales multipotentes, y modificarse genéticamente según la presente invención para que se diferencien en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. El mismo fundamento se aplica para la generación de, por ejemplo, tejido hepático o pancreático. Las secuencias reguladoras de los correspondientes promotores específicos del tipo celular pueden obtenerse a partir de la bibliografía; véase, por ejemplo, "medline" y NCBI.

55

[0068] El procedimiento mencionado anteriormente puede llevarse a cabo de diferentes formas. En primer lugar, según se describe preferentemente en este documento, se produce un clon transgénico múltiple de ME transfectado de forma estable con un cierto número de vectores con un casete de selección farmacológico dirigido por promotores específicos según los tipos celulares que constituyen el tipo de tejido deseable. Por lo tanto, al menos una de dichas células ME o clon de células de la misma es transfectada y seleccionada, en el que dicha célula o clon de células contiene moléculas de ácidos nucleicos recombinantes con al menos dos secuencias reguladoras específicas diferentes específicas del tipo celular. En dicha variante, todos los tipos celulares emergentes tienen su origen en un predecesor común del clon de células ME y la proporción resultante entre los diferentes componentes celulares depende de la velocidad de diferenciación relativa de cada uno de ellos.

65

[0069] Alternativamente, al menos dos células ME diferentes o clones de las mismas se transfectan y seleccionan, en el que dichas al menos dos células diferentes o clones de células contienen moléculas de ácidos nucleicos recombinantes con diferentes secuencias reguladoras específicas del tipo celular. Mediante esta metodología se generan diversos clones transgénicos de ME en los que cada plano individual posee únicamente un vector con un casete de resistencia farmacológica dirigido por uno de los promotores específicos del tipo celular. Para el modelado del tejido, los clones pertinentes deberían ser mezclados con la fase inicial de diferenciación ("gotas colgantes" o "cultivo en masa") con objeto de formar agregados de células ME (CE) en los que, después de la selección farmacológica, los tipos celulares emergentes tienen su origen en diferentes clones de células ME correspondientes, y la proporción final de los componentes celulares también depende de, y puede ser controlada por, la proporción inicial entre las diferentes líneas celulares ME. Este procedimiento preferentemente da como resultado agregados de células que son cuerpos embrioides quiméricos (CE).

[0070] Independientemente de la forma de realización en particular del ensayo de la invención, se prefiere que en las células que constituyen el material biológico que se va a probar, al menos dos de dichos marcadores seleccionables que están unidos operativamente a dichas diferentes secuencias reguladoras específicas del tipo celular sean idénticos. Como se ha mencionado anteriormente, esos marcadores o genes marcadores son preferentemente marcadores seleccionables que confieren resistencia a un agente tóxico para la célula, preferentemente frente a puromicina, metotrexato o neomicina.

[0071] Según se ha escrito anteriormente en este documento, dicha una o más de dichas moléculas de ácidos nucleicos recombinantes pueden comprender adicionalmente un indicador unido operativamente a dicha secuencia específica del tipo celular; véase *supra*. Asimismo, en el presente documento se prefieren las diferentes versiones de color de la proteína fluorescente verde mejorada (GFP), en particular la EYFP (amarilla), la ECFP (azul) y/o la hCRFP (roja) unida operativamente a diferentes secuencias específicas del tipo celular. Asimismo, se prefiere que dicho marcador seleccionable y que dicho indicador sean expresados a partir de un vector bicistrónico, preferentemente en el que dicho marcador seleccionable y dicho indicador están separados por uno o más sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), que están unidos operativamente a al menos uno de dichos genes.

[0072] Como se ha mencionado anteriormente, el material biológico que se va a probar se obtiene mediante un procedimiento que preferentemente se lleva a cabo de tal forma que permite el autoensamblaje de los diferentes tipos celulares, por ejemplo, en los tejidos o las estructuras de tipo tejido deseados que deberían reflejar el tejido o el órgano de un mamífero, preferentemente de un ser humano, que se supone que está expuesto a un compuesto dado. Las células madre están disponibles, en una forma de realización preferida de la invención, en forma de agregados que se conocen como cuerpos embrioides (CE). El documento WO02/051987 describe un protocolo para la obtención de los cuerpos embrioides. La elaboración tiene lugar preferentemente con el procedimiento de la "gota colgante" o mediante un cultivo en metil celulosa (Wobus et al., Differentiation 48 (1991), 172-182).

[0073] Alternativamente a esto, pueden usarse matraces rotatorios (cultivos en agitación) como procedimiento de cultivo. A este respecto, las células ME indiferenciadas son introducidas en los cultivos en agitación y se mezclan permanentemente según un procedimiento establecido. Para ello se introducen 10 millones de células ME en 150 ml de medio con un 20 % de FCS y se agitan constantemente a una velocidad de 20 rpm, en el que la dirección del movimiento de agitación se cambia con regularidad. 24 horas después de la introducción de las células ME se añaden 100 ml adicionales de medio con suero y a continuación se cambian 100 - 150 ml del medio cada día (Wartenberg et al., FASCE J. 15 (2001), 995-1005). En estas condiciones de cultivo pueden obtenerse grandes cantidades de células derivadas de células ME, es decir cardiomiocitos, células endoteliales, neuronas etc., dependiendo de la composición del medio. Las células se seleccionan por medio del gen de resistencia tanto cuando están aún en el cultivo en agitación como después de colocarlas en placas, respectivamente.

[0074] Alternativamente a esto, los CE diferenciados en la gota colgante podrían no colocarse en placa sino mantenerse simplemente en suspensión. Incluso en estas condiciones podría observarse experimentalmente una progresión de una diferenciación. La eliminación mediante un lavado de los tipos celulares no deseados puede realizarse sólo con una mezcla mecánica y la adición de una baja concentración de una enzima (por ejemplo, colagenasa, tripsina); se consigue una suspensión de células individuales con una fácil eliminación mediante un lavado de los tipos celulares no deseados.

[0075] En una forma de realización preferida en particular de la presente invención, los cuerpos embrioides se preparan según un recientemente desarrollado sistema de "cultivo en masa" empleado en los ejemplos anexos y descrito con detalle en la solicitud internacional WO2005/005621 que es un documento de la técnica anterior conforme al Art. 54(3) EPC. Por lo tanto, en una forma de realización preferida en particular, el ensayo tisular funcional de la presente invención se realiza con cuerpos embrioides (CE), preferentemente con CE quiméricos.

[0076] Como se ha mencionado anteriormente, los cuerpos embrioides representan un grupo complejo de células que se diferencian en diferentes tejidos. En una forma de realización, las células de un cuerpo embriode están sustancialmente sincronizadas para su diferenciación. Consecuentemente, a unos intervalos conocidos, la mayoría de las células sincronizadas se diferencian en las tres capas germinales embrionarias y se diferencian

adicionalmente en múltiples tipos de tejidos, tales como cartílago, hueso, músculo liso y estriado y tejido neural, incluyendo los ganglios embrionarios; véase también Snodgrass et al., "Embryonic Stem Cells: Research and Clinical Potentials" en Smith y Sacher, eds. *Peripheral Blood Stem Cells* American Association of Blood Banks, Bethesda MD (1993). Por lo tanto, las células de los cuerpos embrioides proporcionan un modelo más próximo a la complejidad de los organismos completos de lo que lo hacen los ensayos de célula o de levadura individual tradicional, evitando el coste y las dificultades asociadas con el uso de ratones y de mamíferos más grandes. Además, la reciente disponibilidad de cuerpos embrioides humanos mejora las capacidades predictivas de la invención al proporcionar un vehículo incluso más cercano para el modelado de la toxicidad y la identificación de fármacos útiles para el tratamiento de trastornos cardíacos en sistemas orgánicos humanos y en seres humanos.

[0077] El cuerpo embrioide que se va a usar en el ensayo de la invención comprende preferentemente una población de células, la mayoría de las cuales son células pluripotentes capaces de desarrollarse en diferentes estirpes celulares cuando se cultivan en las condiciones apropiadas. Se prefiere que el cuerpo embrioide comprenda al menos un 51 % de células pluripotentes derivadas de células ME. Más preferentemente, el cuerpo embrioide comprende al menos un 75 % de células pluripotentes derivadas de células ME totipotentes. Y aún más preferentemente, el cuerpo embrioide comprende al menos un 95 % de células pluripotentes derivadas de células ME totipotentes.

[0078] En su forma más simple, el ensayo de la presente invención comprende la creación de un perfil molecular que implica poner en contacto los cuerpos embrioides en una matriz de electrodos con una composición química de interés, y determinar después las alteraciones en la actividad eléctrica de dicho material biológico a través de dicha matriz de electrodos, y opcionalmente analizar parámetros adicionales tales como los descritos a continuación en el cuerpo embrioide expuesto a la composición química (el "cuerpo embrioide de prueba") en comparación con un cuerpo embrioide que no ha sido expuesto al agente (un "cuerpo embrioide de control").

[0079] El ensayo de la presente invención también puede llevarse a cabo de tal forma que permita el autoensamblaje de las células en los agregados o las estructuras de tipo tejido en la matriz. Alternativamente, las células diferenciadas son disociadas de los CE y analizadas en la matriz en la suspensión de células o a nivel de una única célula; véanse también los Ejemplos. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, las células que van a ser analizadas en el sistema de ensayo funcional de la presente invención se obtienen mediante una disociación a partir de cuerpos embrioides (CE), preferentemente mediante una tripsinización de los agregados de células; véanse también los ejemplos.

[0080] En una forma de realización particularmente preferida, el procedimiento de la presente invención se realiza con cardiomiocitos positivos para la GEFP derivados de células, preferentemente cardiomiocitos de tipo ventricular o atrial y cardiomiocitos de tipo marcapasos; véanse también los ejemplos.

[0081] En una forma de realización, el destino de los tipos celulares y la formación de los agregados de células y del tejido, así como el estado fisiológico y/o de desarrollo de las células o del agregado de células se analizan antes, durante y/o después de haber sido expuestos al compuesto de prueba, por ejemplo, mediante mediciones de la tensión isométrica, una ecocardiografía y similares; véase también *infra*. Preferiblemente, el estado de las células o de los agregados de células se analiza mediante la monitorización de la diferenciación de la actividad eléctrica de las células en una matriz, por ejemplo, mediante el registro de los potenciales de campo extracelulares con una micromatriz de electrodos (MEA). Las micromatrices de electrodos (MEA) son dispositivos que permiten un registro extracelular múltiple de la generación y la propagación del potencial de acción en, por ejemplo, cardiomiocitos derivados de una célula ME. Estos registros se asemejan al bien conocido ECG según lo usan los médicos. La matriz de las MEA consiste habitualmente en 60 electrodos de oro integrados en el fondo de un dispositivo de cultivo celular diseñado especialmente. Los cuerpos embrioides (CE) derivados de la célula ME pueden ser cultivados en dichos dispositivos. Después de la fijación y la diseminación en la superficie, las células de los CE que contienen los cardiomiocitos entran en contacto con los electrodos. Todos los potenciales de acción extracelulares resultantes pueden entonces ser registrados de forma síncrona durante experimentos de observación tanto a corto como a largo plazo. El siguiente análisis de las frecuencias y las latencias con un programa apropiado permite revelar el "mapa eléctrico" fino de los agregados que laten.

[0082] Por ejemplo, las propiedades electrofisiológicas durante el proceso de diferenciación que se está produciendo en las células madre embrionarias que se están diferenciando en miocitos cardíacos puede ser seguido mediante el registro de los potenciales de campo extracelulares con una micromatriz de electrodos (MEA) que consiste en 60 electrodos integrados en el sustrato se ha descrito en Banach et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (2003), 2114-2123. Adicionalmente, se usaron múltiples matrices de microelectrodos de wolframio para registrar las respuestas simultáneas de las neuronas del tronco del encéfalo que contribuyen a la generación del patrón motor respiratorio; véase Morris et al., *Respir. Physiol.* 121 (2000), 119-133.

[0083] En una forma de realización preferida adicional, los cuerpos embrioides o las células diferenciadas seleccionadas, disociadas y recolocadas en placas *in vitro* se cultivan y se analizan en plantas de cultivo celular recubiertas con fibronectina. En una forma de realización particularmente preferida, las micromatrices de electrodos que se van a usar según el sistema de ensayo de la presente invención están recubiertas con fibronectina; véase

también el Ejemplo 2. Esta forma de realización es particularmente ventajosa, dado que podría demostrarse que, por un lado, el recubrimiento con fibronectina permitió una ubicación individual constante de las células sembradas, y por otro lado, no interfiere en el crecimiento y la viabilidad de las células. Los procedimientos para el recubrimiento de superficies, por ejemplo, con fibronectina, son conocidos por la persona experta en la materia; véase también el 5 User Manual for the Micro-Electrode Array (MEA) de Multichannel Systems.

[0084] En una forma de realización particularmente preferida del sistema de ensayo funcional de la presente invención, se analizan los parámetros frecuencia, contractilidad media, amplitud de contracción máxima y área 10 media bajo la curva (AUC) de contractilidad. Sin pretender estar ligados a ninguna teoría, se cree, según la presente invención, que los parámetros contractilidad media y contracción máxima (amplitud) reflejan los efectos fisiológicos de, por ejemplo, los agonistas de los receptores β -adrenérgicos y los antagonistas del calcio, es decir, aumentan y disminuyen la contractilidad y la frecuencia, respectivamente, de una forma correcta, mientras los correspondientes 15 controles de vehículo no deberían mostrar ningún cambio.

[0085] Se pueden analizar los parámetros mencionados anteriormente de cualquier sustancia, opcionalmente en comparación con los agonistas y antagonistas conocidos, respectivamente. A partir de los valores resultantes de los parámetros, ejemplo, la contractilidad media y la amplitud de contracción máxima, es posible entonces 20 caracterizar cualitativa y cuantitativamente la sustancia de prueba, por ejemplo, si es un agonista o un antagonista, y si su efecto es más o menos cruzado que un patrón dado. El procedimiento de la presente invención es por lo tanto perfectamente adecuado para las pruebas de toxicidad y la caracterización de compuestos.

[0086] Los procedimientos para el análisis computacional de los datos de micromatrices son conocidos en la materia; véase, por ejemplo, Quackenbush, Nature Reviews 2 (2001), 418-427 y Brazma et al., Nature Genetics 29 25 (2001), 365-371. Generalmente, el análisis estadístico puede realizarse mediante el uso de la prueba de la t bilateral y considerando las diferencias significativas a $P < 0,05$ o a $P < 0,01$. Puede realizarse un análisis de regresión lineal y determinarse los coeficientes de correlación mediante el uso del programa Excel 2000 (Microsoft Seattle, WA, Estados Unidos). El análisis de los agregados de los datos de la micromatriz puede llevarse a cabo mediante el uso de, por ejemplo, los programas disponibles en forma de programas compartidos del laboratorio de Michael Eisen (<http://rana.lbl.gov>).

[0087] En una forma de realización preferida del procedimiento de la presente invención, los cardiomiocitos diferenciados *in vitro* derivados de una célula ME se disocian enzimáticamente a partir de agregados de células tales como los CE mediante una tripsinización. Los cardiomiocitos, preferentemente de un tipo en particular, por ejemplo, atrial y marcapasos o ventricular, son seleccionados para un análisis contráctil. Los cardiomiocitos se cargan en una 35 MEA, preferentemente recubierta con fibronectina, se montan en la platina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert 25 (objetivo a 20x), preferentemente a través de un adaptador de calentamiento, y se recubre de forma continua con tampón fisiológico oxigenado que contiene, por ejemplo, NaCl 132 mM, KCl 4,8 mM, MgCl₂ 12 mM, HEPME 10 mM, ácido pirúvico 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, a un pH de 7,2, a 37 °C. Los cardiomiocitos pueden ser electroestimulados mediante el uso de un estimulador de campo Myopacer (IonOptix, Milton, MA) para producir una 40 contracción a 1, 2, 5 y 10 Hz en ausencia o en presencia, por ejemplo, de isoproterenol 10 nM. Puede usarse un sistema de video IonOptix (Milton, MA) para registrar la longitud de la célula mediante una detección de dos bordes. Los datos pueden ser adquiridos a una velocidad de muestreo de 240 Hz y analizados mediante el programa informático SoftEdge de IonOptix. Los datos pueden ser exportados al programa Excel, y el análisis estadístico puede realizarse mediante el uso de la prueba de la t de Student.

[0088] Por lo tanto, el ensayo de la invención puede usarse para una diversidad de propósitos, por ejemplo, para analizar la influencia de factores y de compuestos sobre la formación de tejido durante el desarrollo 45 embrionario.

[0089] En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere a matrices para su uso en el ensayo de la presente invención que comprenden un soporte sólido y, unidas al mismo o suspendidas en el mismo, 50 células, agregados de células o tejido obtenido mediante el procedimiento de la presente invención o que está en el proceso de diferenciación. El uso de micromatrices de electrodos planas para las células y los agregados de células cultivados como biosensores es de particular interés. Dichas matrices consisten generalmente en un sustrato de vidrio, de plástico o de silicio sobre el cual se deposita y se graba un conductor, por ejemplo, oro, platino, óxido de indio y estaño, iridio, etc. Se deposita una capa aislante, por ejemplo, fotorresistente, de poliimida, dióxido de silicio, 55 nitrato de silicio, etc., sobre los electrodos conductores y se interconecta, y después se eliminan las regiones sobre los electrodos para definir los sitios de registro. Las células se cultivan directamente en esta superficie y entran en contacto con el conductor expuesto en los sitios de registro no aislados. Dependiendo del tamaño de los electrodos y de las células, los registros de la actividad eléctrica pueden proceder de una única célula o de poblaciones de 60 células que incluyen agregados de células. Cada sitio del electrodo está conectado generalmente con la entrada de una entrada de alta impedancia, un amplificador de bajo ruido, con o sin condensadores de acoplamiento de CA, para permitir la amplificación de las relativamente pequeñas señales extracelulares. Algunos ejemplos de dichos biosensores se describen en Novak et al. IEEE Transactions on Biomedical Engineering BME-33 (2) (1986), 196-202; en Drodge et al., J. Neuroscience Methods 6 (1986), 1583-1592; en Eggers et al., Vac. Sci. Technol. B8 (6) 65 (1990), 1392-1398; en Martinoia et al., J. Neuroscience Methods 48 (1993), 115-121; en Maeda et al., J.

Neuroscience 15 (1995), 6834-6845; y en Mohr et al. Sensors and Actuators B-Chemical 34 (1996) 265-269. El uso de un aparato en el procedimiento de ensayo reivindicado preparado y adaptado para el análisis de las matrices descritas anteriormente también es un objeto de la presente invención.

5 **[0090]** El sistema de ensayo funcional tisular de la presente invención es particularmente adecuado para su uso en el cribado de fármacos y en aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, pueden usarse células madre diferenciadas para el cribado de los factores (tales como disolventes, fármacos de molécula pequeña, péptidos, polinucleótidos, y similares) o de las condiciones medioambientales (tales como condiciones de cultivo o de manipulación) que afectan a las características de las células diferenciadas. Algunas aplicaciones de cribado en particular de esta invención se refieren a las pruebas de compuestos farmacéuticos en la investigación farmacológica. El lector puede referirse de forma general al libro de texto convencional "In vitro Methods in Pharmaceutical Research", Academic Press, 1997, y a la Patente de Estados Unidos US-A-5.030.015). La evaluación de la actividad de los compuestos farmacéuticos candidatos implica generalmente la combinación de las células diferenciadas de esta invención con el compuesto candidato, la determinación de cualquier cambio en la morfología, el fenotipo marcador o la actividad metabólica de las células que sea atribuible al compuesto (en comparación con las células sin tratar o con las células tratadas con un compuesto inerte), y correlacionando después el efecto del compuesto con el cambio observado. El cribado puede llevarse a cabo, por ejemplo, bien porque el compuesto está diseñado para tener un efecto farmacológico sobre ciertos tipos celulares, o bien porque un compuesto diseñado para tener efectos en cualquier parte puede tener efectos secundarios no deseados. Pueden probarse dos o más fármacos en combinación (mediante la combinación con las células tanto simultáneamente como secuencialmente), para detectar los posibles efectos de interacción entre los fármacos. En algunas aplicaciones, los compuestos son cribados inicialmente para evaluar su potencial toxicidad (Castell et al., páginas 375-410 en "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1997). La citotoxicidad puede ser determinada en primera instancia mediante el efecto sobre la viabilidad, la supervivencia, la morfología de la célula, y la expresión o la liberación de ciertos marcadores, receptores o enzimas. Los efectos de un fármaco sobre el ADN cromosómico pueden ser determinados mediante la medición de la síntesis o de la reparación del ADN. La incorporación de [H]timidina o de BrdU, especialmente en unos momentos no programados del ciclo celular, o por encima del nivel requerido para la replicación celular, es coherente con un efecto farmacológico. Algunos efectos no deseados pueden incluir también unas velocidades no habituales de intercambio de cromáticas hermanas, determinada por la diseminación de la metafase. El lector puede hacer referencia a A. Vickers (págs. 375-410 en "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1997) para una elaboración adicional.

[0091] Los parámetros mencionados anteriormente pueden usarse en el sistema de ensayo funcional tisular de la presente invención como uno cualquiera de dichos parámetros adicionales, además de la medición de la actividad eléctrica de dicho material biológico a través de dicha matriz de electrodos.

[0092] Preferiblemente, en los ensayos de la presente invención se usan cuerpos embrioides para probar la composición química; véase también *infra*. La elección de la especie en particular a partir de la cual deriva el cuerpo embriode normalmente reflejará un equilibrio de varios factores. En primer lugar, dependiendo del propósito del estudio, una o más especies pueden ser de particular interés. Por ejemplo, los cuerpos embrioides humanos serán de particular interés para su uso con composiciones que están siendo probadas como potenciales productos terapéuticos humanos, pero también para pruebas toxicológicas de sustancias que incluyen productos químicos industriales, mientras que los cuerpos embrioides equinos, felinos, bovinos, porcinos, caprinos, caninos o de oveja pueden ser de más interés para un potencial producto terapéutico veterinario. Los cuerpos embrioides de otras especies usados habitualmente en las pruebas preclínicas, tales como cobayas, ratones, ratas, conejos, cerdos y perros, también son preferidos. Normalmente, los cuerpos embrioides de estas especies se usarán para el cribado "de primer paso", o cuando no sea necesaria una información detallada sobre la toxicidad en seres humanos, o cuando un resultado en una especie murina o en otra de estas especies de laboratorio se haya correlacionado con una toxicidad conocida u otro efecto en los seres humanos. Adicionalmente, con respecto a los productos terapéuticos humanos, las agencias sanitarias generalmente requieren los datos con animales antes de que puedan comenzar los ensayos con seres humanos; generalmente será deseable el uso de los cuerpos embrioides de las especies que se usarán en los estudios preclínicos con animales. Los resultados de las pruebas de toxicidad en los cuerpos embrioides pueden entonces orientar al investigador sobre el grado y el tipo de toxicidad que se puede anticipar durante los ensayos con animales. Algunas especies animales son conocidas en la materia por ser mejores modelos de diferentes tipos de toxicidad en seres humanos que otras, y las especies también difieren en su capacidad para metabolizar los fármacos; véase, por ejemplo, Williams, Environ. Health Perspect. 22 (1978), 133-138; Duncan, Adv. Sci. 23 (1967), 537-541. Por lo tanto, la especie preferida en particular para su uso en un estudio de toxicidad preclínico en particular puede variar según el uso previsto del fármaco candidato. Por ejemplo, una especie que proporciona un modelo adecuado para un fármaco previsto para que afecte al sistema reproductor puede no ser tan adecuada como un modelo para un fármaco previsto para que afecte al sistema nervioso. Los criterios para la selección de las especies apropiadas para las pruebas preclínicas son bien conocidos en la materia.

[0093] Una vez que se ha iniciado el cultivo de un cuerpo embriode, puede ponerse en contacto con una composición química. Convenientemente, la composición química está en una solución acuosa, preferentemente en un disolvente usado convencionalmente en un cultivo celular, por ejemplo, DMSO, y es introducido en el medio de cultivo; véanse también los Ejemplos. La introducción puede ser mediante cualquier medio conveniente, pero

habitualmente será por medio de una pipeta, de un micropipeteador o de una jeringa. En algunas aplicaciones, tales como el cribado de alto rendimiento, las composiciones químicas serán introducidas a través de un medio automatizado, tal como sistemas de pipeteo automatizados, que pueden estar en brazos robóticos. Las composiciones químicas también pueden ser introducidas en el medio en forma de un polvo o en forma sólida, con o sin excipientes, aglutinantes y otros materiales farmacéuticos usados habitualmente en las composiciones farmacéuticas, o con otros portadores que pudieran ser empleados en el uso previsto. Por ejemplo, las composiciones químicas previstas para su uso como productos químicos agrícolas o como agentes petroquímicos pueden ser introducidas en el medio por sí mismas para probar la toxicidad de esos productos o agentes químicos, o ser introducidas junto con otros materiales con los que pudieran ser usadas o que pudieran encontrarse en el entorno, para determinar si la combinación de los productos o de los agentes químicos tiene un efecto sinérgico. Normalmente, los cultivos se agitarán al menos brevemente después de la introducción de una composición química para asegurar que la composición es dispersada por todo el medio.

[0094] El momento en el que la composición química es añadida al cultivo está a la discreción del profesional y variará según el objetivo en particular del estudio. Convenientemente, la composición química se añadirá tan pronto como el cuerpo embrioide se desarrolle a partir de las células madre, permitiendo la determinación de la alteración en la expresión de la proteína o del gen sobre el desarrollo de todos los tejidos del cuerpo embrioide. Sin embargo, puede ser de interés centrar el estudio en el efecto de la composición sobre un tipo de tejido en particular. Como se ha indicado previamente, se sabe que los tejidos individuales, tales como el tejido muscular, nervioso y hepático, se desarrollan en unos momentos específicos después de que se haya formado el cuerpo embrioide. La adición de la composición química puede, por lo tanto, graduarse para que se produzca en el momento en el que comienza a desarrollarse el tejido de interés, o en un momento elegido después del comienzo de ese desarrollo, con objeto de observar el efecto sobre la alteración en la expresión del gen o de la proteína en el tejido de interés.

[0095] Se usarán diferentes cantidades de una composición química para que entren en contacto con un cuerpo embrioide o con una célula, dependiendo de la cantidad de información conocida sobre la toxicidad de esa composición, el propósito del estudio, el tiempo disponible y los recursos del profesional. Una composición química puede ser administrada únicamente a una concentración, particularmente cuando otros estudios o trabajos anteriores o la experiencia de campo con el compuesto han indicado que una concentración en particular es la que se encuentra más habitualmente en el cuerpo. De forma más habitual, la composición química será añadida en diferentes concentraciones a los cultivos de los cuerpos embrioides o de las células realizados en paralelo, de forma que puedan evaluarse los efectos de las diferencias en la concentración sobre la expresión del gen o de la proteína, y por lo tanto, las diferencias en la toxicidad de la composición a diferentes concentraciones. Normalmente, por ejemplo, la composición química será añadida a una concentración normal o intermedia, y distanciada por aumentos y disminuciones de dos veces o de cinco veces en la concentración, dependiendo del grado de precisión deseado.

[0096] Cuando la composición tiene una toxicidad desconocida es conveniente realizar en primer lugar un estudio preliminar para determinar los intervalos de concentración a los que se probará la composición. En la materia se conoce una diversidad de procedimientos para la determinación de las dosis de concentración. Un procedimiento habitual es, por ejemplo, determinar la dosis a la que el agente es directamente tóxico. Después, el profesional reduce la dosis a la mitad y lleva a cabo un estudio de dosificación, normalmente mediante la administración del agente de interés a unas diluciones de cinco veces o de dos veces la concentración en cultivos paralelos de las células del tipo de interés. Para los contaminantes medioambientales, la composición habitualmente también será probada a la concentración a la que se encuentra en el medio ambiente. Para productos químicos agrícolas, tales como pesticidas que dejan residuos en los productos alimenticios, el agente se probará habitualmente a la concentración a la que se encuentra el residuo, aunque también es probable que se pruebe a otras concentraciones. Por lo tanto, la dilución de los compuestos de prueba puede realizarse mediante la preparación, en tubos separados, de una serie de diluciones de 50 o de 100 veces los compuestos concentrados en DMSO. Se distribuyen uno o dos µl de cada dilución en cada pocillo antes de la distribución de la suspensión de células.

[0097] Las consideraciones anteriores con respecto a poner en contacto los compuestos con los CE, al tiempo de contacto, etc., también son aplicables a los ensayos de la invención que se llevan a cabo, por ejemplo, con células ME, tejido y animales no humanos, si fuera aplicable.

[0098] Por lo tanto, según se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo tisular y celular funcional *in vitro* para la obtención y/o la caracterización de un fármaco según se caracteriza con detalle en la reivindicación 1, que comprende:

- (a) cultivar un material biológico que comprende células, un agregado de células, un tejido o un órgano preparado según la presente invención en una matriz de electrodos;
- (b) someter dicho material biológico a una sustancia de prueba; y
- (c) medir la actividad eléctrica de dicho material biológico a través de dicha matriz de electrodos, y analizar uno cualquiera o todos los parámetros según se especifica en la reivindicación 1.

Este ensayo se lleva a cabo preferentemente con una multi- o micromatriz de electrodos (MEA), tal como las mencionadas anteriormente. Este sistema de ensayo de la presente invención es una ventajosa alternativa en

particular frente a los ensayos con animales para los análisis de los efectos cardíacos, que habitualmente son largos y costosos. Por lo tanto, el sistema de ensayo funcional tisular es particularmente útil en el desarrollo de fármacos y en las pruebas de toxicidad de cualquier compuesto con el que un ser humano o un animal pudiera entrar en contacto. Preferiblemente, dichos agregados de células son CE; véase también *supra*.

5

[0099] Una forma de realización preferida en particular del sistema de ensayo funcional tisular de la presente invención emplea los denominados cardiocuerpos, es decir, cuerpos embrioides (CE) diferenciados en cardiomiocitos y que representan un tejido cardíaco funcional que consiste en cardiomiocitos atriales y ventriculares así como células marcapasos. Habitualmente, dicha matriz de electrodos es una multi- o micromatriz de electrodos (MEA) tal como las descritas anteriormente en el presente documento.

10

[0100] Según el sistema de ensayo de la presente invención, se analizan uno cualquiera de, o todos, los siguientes parámetros:

15

(i) canales de Na⁺;
 (ii) canales de Ca²⁺/K⁺;
 (iii) canales de K⁺;
 (iv) amplitud y/o duración del potencial de campo (FDP),
 (v) cronotropía de las células cardíacas o de los periodos de ráfagas ("burst") de las células neuronales;

20

(vi) arritmias, fenómenos de tipo EAD;
 (vii) valor del pH;
 (viii) presión parcial de oxígeno (pO₂);
 (ix) parada cardíaca; y/o
 (x) análisis de la disociación de la contractilidad AV, de los efectos del NO y/o de los cambios morfológicos.

25

[0101] Las MEA y los procedimientos para su uso en el análisis de células biológicas son conocidos por la persona experta en la materia. Por ejemplo, la solicitud internacional WO97/05922 describe una configuración de un microelectrodo para filtraciones, con resolución local, potenciales de celda eléctricos o para la estimulación eléctrica de redes de células biológicas tales como, por ejemplo, cultivos de células, cortes de tejidos "*in vitro*" o tejido biológico "*in vivo*". Puede usarse un dispositivo de microelementos tal como describe en la solicitud internacional WO98/22819, que tiene una pluralidad de microelementos, que pueden estar configurados en forma de microelectrodos, dispuestos sobre un sustrato y adaptados para entrar en contacto con las células presentes en un entorno líquido. Las células se guían hacia los microelectrodos, se aíslan o se atraen mecánicamente a los microelectrodos. Puede aplicarse una fuerza de presión negativa o una fuerza hidrodinámica sobre las células. Además, el uso de una matriz de electrodos según se describe en la solicitud internacional WO01/65251 puede ser adaptado según las enseñanzas de la presente invención.

30

35

[0102] Para el análisis de los datos de multielectrodos pueden usarse numerosas herramientas disponibles en la técnica anterior, véase, por ejemplo, Egert et al., "MEA-tools: An open source toolbox for the analysis of multielectrode data with MATLAB. J. Neuroscience Methods 117 (2002), 33-42, y Banach et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 284 (2003), H2114-2123).

40

[0103] En una forma de realización preferida, el material biológico comprende cuerpos embrioides (CE) diferenciados en cardiomiocitos, lo más preferentemente CE que consisten en tejido cardíaco funcional que late de forma autónoma y cubre las propiedades electrofisiológicas de los cardiomiocitos atriales y ventriculares, así como de las células marcapasos.

45

[0104] Los procedimientos y los ensayos descritos en este documento pueden sustituir a diversos modelos animales y formar nuevas pruebas basadas en seres humanos y biosensores medioambientales extremos. En particular, los procedimientos de la invención pueden usarse para pruebas toxicológicas, mutágenas y/o teratógenas *in vitro*. Dado que las células y el tejido obtenido según la presente invención se parecen más estrechamente a la situación *in vivo*, se espera que los resultados obtenidos mediante los ensayos toxicológicos de la presente invención se correlacionen también con la teratogenia de los compuestos probados.

50

[0105] En una forma de realización ventajosa en particular de la presente invención, los ensayos descritos anteriormente se usan como un sistema alternativo para los ensayos con animales de los efectos cardíacos de los compuestos, lo que es bastante largo y caro. Esta forma de realización está basada en los "cardiocuerpos", es decir, en los cuerpos embrioides (CE) diferenciados en cardiomiocitos, preferentemente aquellos obtenibles mediante el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO2005/005621. Dichos cardiocuerpos derivan preferentemente de células madre embrionarias de ratón y consisten en tejido cardíaco funcional que late de forma autónoma y cubre las propiedades electrofisiológicas de los cardiomiocitos atriales y ventriculares, así como las células marcapasos.

60

[0106] En una forma de realización preferida en particular, en los ensayos de la presente invención se usan las células ME de la línea celular de ratón R1 (Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90 (1993), 8424-8428; número de la ATCC SCRC-1011) o de una línea celular derivada de la misma. Los experimentos llevados a cabo según la presente invención revelaron que el uso de cardiomiocitos derivados de la línea de células ME murinas R1 dio lugar

65

a una mejora sustancial en la proporción entre señal y ruido del sistema de la multimatriz de electrodos de la presente invención en comparación con el uso de los cardiomiocitos derivados de la línea de células D3 (Doetschman et al., J. Embryol. Exp. Morphol. 87 (1985), 27-45; Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85 (1988), 8583-8587; número de la ATCC CRL-1934 y CRL-11632). Sin pretender estar ligados a ninguna teoría, se cree que la mejora en el ensayo es debida a una mejor adhesión de esta línea celular en particular sobre la multimatriz de electrodos.

[0107] En una forma de realización, los cardiocuerpos o las células disociadas de los mismos se colocan en placa sobre un sistema de multimatriz de electrodos (MEA, MultiChannel Systems, Reutlingen, Alemania). Los registros de los potenciales de campo extracelulares con micromatrices de electrodos que consisten en 60 electrodos integrados en el sustrato pueden llevarse a cabo según se describe, por ejemplo, en Banach et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 284 (2003), H2114-2123. Los registros extracelulares del potencial de campo reflejan los cambios electrofisiológicos durante la excitación de los cardiomiocitos de los cardiocuerpos. En una forma de realización preferida en particular, se lleva a cabo un análisis automatizado mediante el uso del programa informático AxioTools desarrollado por AxioGenesis AG, Cologne, Alemania.

[0108] El ensayo de la presente invención fue evaluado con compuestos con unos efectos conocidos sobre los canales iónicos presentes en el tejido cardíaco, por ejemplo, cisaprida, lidocaína, isoproterenol y nifedipino, que se probaron tanto en el ensayo de la presente invención como en reparaciones de conejo Langendorff. Todos los compuestos mostraron unos resultados similares en ambos sistemas de prueba, así como una correlación en el análisis de pinzamiento zonal de membrana y de MEA, que da lugar a la implementación del ensayo de la presente invención en las rutinas de cribado de seguridad cardíaca. Con objeto de conseguir unos resultados más fiables, preferentemente se analiza la mayor parte de, sino todos, los siguientes parámetros, si fuera aplicable:

- (i) canales de Na⁺;
- (ii) canales de Ca²⁺/K⁺;
- (iii) canales de K⁺;
- (iv) amplitud y/o duración del potencial de campo (FDP),
- (v) cronotropía de las células cardíacas o de los periodos de ráfagas ("burst") de las células neuronales;
- (vi) arritmias, fenómenos de tipo EAD;
- (vii) valor del pH;
- (viii) presión parcial de oxígeno (pO₂);
- (ix) parada cardíaca; y/o
- (x) análisis de la disociación de la contractilidad AV, de los efectos del NO y/o de los cambios morfológicos.

[0109] Las ventajas de esta forma de realización en particular de los sistemas de cribado de la presente invención con respecto a los ensayos convencionales *in vitro* incluyen

- un modelo de cultivo celular muy estandarizado, homogéneo y reproducible para la producción de cardiocuerpos;
- presencia de células atriales, ventriculares y de marcapasos con un comportamiento fisiológico normal (por ejemplo, expresión y regulación de los canales iónicos);
- cribado de tipo ECG de todas las propiedades electrofisiológicas del cardiocuerpo, incluyendo los efectos sobre todos los canales iónicos, la cronotropía y el aspecto de las arritmias;
- sistema basado totalmente *in vitro*, no se requiere una laboriosa preparación de las células
- ahorra tiempo y dinero

[0110] Por lo tanto, en los diversos ensayos de la presente invención, pueden probarse compuestos, en particular compuestos cardioactivos, según los procedimientos descritos en el documento DE 195 25 285 A1; en Seiler et al., ALTEX 19 Supl. 1 (2002), 55-63; en Takahashi et al., Circulation 107 (2003), 1912-1916 y en Schmidt et al., Int. J. Dev. Biol. 45 (2001), 421-429; describiendo el último la prueba con células ME (MET) usada en un estudio de validación de la Unión Europea para el cribado de agentes embriotóxicos mediante la determinación de la diferenciación dependiente de la concentración de células ME en células cardíacas y miógenas.

[0111] Las células y el tejido del sistema nervioso central (SNC) generados mediante los procedimientos de la presente invención o durante la diferenciación es dichos procedimientos pueden probarse, por ejemplo, en cultivos de células tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos US-A-6.498.018. De forma análoga, pueden probarse las células y el tejido relacionado con el hígado; véase, por ejemplo, el documento US2003/0003573. Un procedimiento adicional de prueba *in vitro* para la detección de los efectos inducidos químicamente sobre el desarrollo embrionario y para la diferenciación con el propósito de un cribado de embriotoxicidad/teratogenia basado en células madre embrionarias (ME) pluripotentes diferenciadas de ratones y ratas usando células germinales embrionarias (GE) obtenidas a partir de células germinales primordiales se describe en el documento WO97/01644, y puede ser adaptado según las enseñanzas de la presente invención.

[0112] Las células y el tejido del SNC también pueden ser analizados mediante el uso de una matriz de electrodos como se ha descrito anteriormente. Los medios y los procedimientos para el análisis de las interacciones reguladoras de la actividad neuronal de los cultivos de células y de tejido en micromatrices de electrodos son

conocidos por la persona experta en la materia; véase, por ejemplo, van Bergen et al., Brain Res. Brain Res. Protocol 2003/11 (2003), 123-133 y la solicitud internacional WO01/65251.

[0113] Las formulaciones de compuestos preferidas para las pruebas no incluyen componentes adicionales, tales como conservantes, que tienen un efecto significativo sobre la formulación global; véase también *supra*. Por lo tanto, las formulaciones preferidas consisten esencialmente en un compuesto biológicamente activo y un portador fisiológicamente aceptable, por ejemplo, agua, etanol, DMSO, etc. Sin embargo, si un compuesto es líquido sin ningún excipiente en la formulación puede consistir esencialmente en el propio compuesto. Adicionalmente, puede realizarse una pluralidad de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones del compuesto para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Como se sabe en la materia, la determinación de la concentración eficaz de un compuesto normalmente usa un intervalo de concentraciones resultante de unas diluciones a 1:10 o a otra escala logarítmica. Las concentraciones pueden refinarse adicionalmente con una segunda serie de diluciones si fuera necesario. Normalmente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, una concentración de cero o por debajo del nivel de detección.

[0114] Los compuestos de interés engloban numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas; véase también *supra*. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente puentes de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre las biomoléculas, incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

[0115] Los compuestos y los agentes candidatos se obtienen a partir de una gran diversidad de fuentes, incluyendo colecciones de compuestos sintéticos naturales. Por ejemplo, hay disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una gran diversidad de compuestos orgánicos y de biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, las colecciones de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen con facilidad. Por ejemplo, la inhibición de la angiogénesis inducida por un tumor y la expresión de la metaloproteinasas de la matriz en cultivos de confrontación de cuerpos embrioides y de esferoides tumorales mediante los ingredientes vegetales usados en la medicina tradicional china ha sido descrita por Wartenberg et al. en Lab. Invest. 83 (2003), 87-98.

[0116] Adicionalmente, los colecciones los compuestos naturales o producidos sintéticamente se modifican con facilidad a través de los medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir colecciones combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden ser sometidos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales.

[0117] Los compuestos también pueden ser incluidos en una muestra que incluye fluidos a los cuales se han añadido componentes adicionales, por ejemplo, componentes que afectan a la fuerza iónica, el pH, la concentración total de proteínas, etc. Además, las muestras pueden tratarse para conseguir un fraccionamiento o una concentración al menos parcial. Las muestras biológicas pueden almacenarse si se tiene cuidado en reducir la degradación del compuesto, por ejemplo, en una atmósfera de nitrógeno, congeladas o una combinación de los mismos. El volumen de la muestra usado es suficiente para permitir una detección medible, habitualmente es suficiente con entre aproximadamente 0,1 µl y 1 ml de una muestra biológica.

[0118] Los compuestos de prueba incluyen todas las clases de moléculas descritas anteriormente, y pueden comprender adicionalmente muestras con un contenido desconocido. Aunque muchas muestras comprenderán compuestos en solución, las muestras sólidas que puedan disolverse en un disolvente adecuado también pueden ser ensayadas. Las muestras de interés incluyen muestras medioambientales, por ejemplo, agua subterránea, agua marina, residuos de minería, etc.; muestras biológicas, por ejemplo, lisados preparados a partir de cultivos, muestras de tejido, etc.; muestras de fabricación, por ejemplo, durante el curso temporal de la preparación de productos farmacéuticos; así como colecciones de compuestos preparados para su análisis; y similares. Las muestras de los compuestos de interés cuyo potencial terapéutico se va a evaluar, es decir, los fármacos candidatos.

[0119] El compuesto de prueba puede ser opcionalmente una colección combinatoria para el cribado de una pluralidad de compuestos. Dicha colección de sustancias de prueba, que puede tener una diversidad de entre aproximadamente 10^3 y aproximadamente 10^5 , se reduce sucesivamente al llevar a cabo el procedimiento, opcionalmente combinada con otras dos veces o más. Los compuestos identificados en el procedimiento de la invención pueden ser adicionalmente evaluados, detectados, clonados, secuenciados, y similares, tanto en solución como después de su unión sobre un soporte sólido, mediante cualquier procedimiento que se aplique habitualmente para la detección de una secuencia específica de ADN, tal como una PCR, una restricción de oligómero (Saiki et al., Bio/Technology, 3 (1985), 1008-1012), un análisis con una sonda de oligonucleótidos específico de alelos (ASO) (Conner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 80 (1983), 278), ensayos de ligación de oligonucleótidos (OLA)

(Landegren et al., Science, 241 (1988), 1077), y similares. Las técnicas moleculares para el análisis del ADN han sido revisadas (Landegren et al., Science, 242 (1988), 229-237). Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención también puede usarse para la caracterización transcripcional de células embrionarias y madre adultas; véase, por ejemplo, Ramalho-Santos et al., Science 298 (2002), 597-600; Tanaka et al., Genome Res. 12 (2002), 5 1921-1928.

[0120] La incubación incluye unas condiciones que permiten el contacto entre el compuesto de prueba y la célula ME o las células derivadas de ME. Como se ha descrito anteriormente, es deseable probar una matriz de compuestos o de moléculas pequeñas en una única o unas pocas células ME sobre un "chip" o en otro soporte sólido. Por ejemplo, los cardiomiocitos o las neuronas en los chips proporcionarían una lectura de la velocidad de 10 contracción o del número de disparos, respectivamente, en respuesta a un compuesto y para la detección de agentes medioambientales perjudiciales o al menos biológicamente activos. Las matrices de electrodos neuronales biológicamente compatibles permiten que las células madre experimenten una diferenciación adicional en la propia matriz. Estas matrices permiten la medición de los cambios en tiempo real 15 en la actividad eléctrica de las neuronas derivadas de ME en respuesta a la presencia de agentes conocidos o no identificados. La actividad eléctrica de los cardiomiocitos puede ser monitorizada colocando en placas las células sobre una matriz de microelectrodos extracelulares (Connolly et al., Biosens. Biores. 5 (1990), 223-234). Las células muestran unas contracciones regulares, y la señal extracelular registrada mostraba una relación con los registros del voltaje intracelular (Connolly et al., *supra*). Este procedimiento no invasivo permite una monitorización a largo plazo, 20 y es más simple y más robusto que las típicas técnicas de pinzamiento zonal total de membrana.

[0121] El ensayo de la presente invención es particularmente adecuado para proporcionar patrones de referencia de modulación y bases de datos de patrones de referencia de modulación de una amplia variedad de 25 compuestos biológicamente activos. Los patrones de referencia se usan después para la identificación y la clasificación de los compuestos de prueba. La evaluación de los compuestos de prueba puede usarse para conseguir unos resultados diferentes. Los procedimientos para la clasificación de agentes biológicos según la firma de densidad espectral de los cambios provocados en el potencial eléctrico celular son conocidos por la persona experta en la materia; véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos US-A-6.377.057. Por lo tanto, los compuestos biológicamente activos se clasifican según su efecto sobre los canales iónicos, los cambios en el 30 potencial de membrana y las corrientes iónicas, y el contenido de frecuencia de los potenciales de acción que el (los) compuesto(s) provoca(n) en las células excitables. Los cambios en la densidad espectral de dicho potencial de membrana o potencial de acción provocado son característicos de cada tipo de canal que está modulado por el compuesto de prueba. El patrón de los cambios espectrales en el potencial de membrana se determina poniendo en contacto una célula sensible con un compuesto y monitorizando el potencial de membrana o las corrientes iónicas 35 con el tiempo. Estos cambios se correlacionan con el efecto de ese compuesto, o clase de compuestos, sobre los canales iónicos de la célula respondedora. Este patrón de cambios espectrales proporciona una firma única para el compuesto y proporciona un procedimiento útil para la caracterización de los agentes moduladores de canales. El efecto de un compuesto sobre los canales iónicos, y sobre el potencial de acción de una célula viva, puede proporcionar información útil sobre la clasificación y la identidad del compuesto. Los procedimientos y los medios 40 para la extracción de dicha información son de particular interés para el análisis de compuestos biológicamente activos, con aplicaciones específicas en el cribado farmacéutico, el descubrimiento de fármacos, la monitorización medioambiental, la detección y la clasificación de la guerra biológica, y similares. Algunos ejemplos de biosensores basados en células completas se describen en Gross et al., Biosensors and Bioelectronics 10 (1995), 553-567; en Hickman et al. Abstracts of Papers American Chemical Society 207 (1994), BTEC 76; y en Israel et al. American 45 Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 27 (1990), H1906- H1917.

[0122] Connolly et al., Biosens. Biores. 5 (1990), 223-234 describen una matriz plana de microelectrodos desarrollada para la monitorización de la actividad eléctrica de las células de un cultivo. El dispositivo permite la 50 incorporación de características topográficas de la superficie en una capa aislante por encima de los electrodos. Se emplea una tecnología de semiconductor para la fabricación de los electrodos de oro y para la deposición y el grabado de una capa aislante de nitruro de silicio. Los electrodos se probaron usando un cultivo de células cardiacas de miocitos embrionarios de pollo, y el latido físico de las células cultivadas se correlacionaba con las mediciones simultáneas obtenidas del voltaje extracelular. El control molecular de los canales iónicos cardiacos es revisado por Clapham, Heart Vessels Supl. 12 (1997), 168-169. Oberg y Samuelsson, J. Electrocardiol. 14 (1981), 13942, llevan a 55 cabo un análisis de las fases de repolarización de los potenciales de acción cardíacos. Rasmussen et al. American Journal of Physiology 259 (1990), H370-H389, describen un modelo matemático de actividad electrofisiológica en la aurícula de la rana toro.

[0123] Existe un amplio cuerpo bibliográfico en el área general de canales iónicos. Una revisión de la 60 bibliografía puede encontrarse en la serie de libros "The Ion Channel Factsbook", volúmenes 1-4, de Edward C. Conley y William J. Brammar, Academic Press. Se proporciona una revisión de: los canales iónicos extracelulares operados por ligando (ISBN: 0121844501), los canales intracelulares operados por ligando (ISBN: 012184451X), los canales rectificadores de entrada e intercelulares (ISBN: 0121844528) y los canales operados por voltaje (ISBN: 0121844536). Hille, B. (1992) "Ionic Channels of Excitable Membranes", 2.sup.nd Ed. Sunderland MA: Sinauer 65 Associates, también revisa los canales de potasio.

- [0124]** En otro aspecto, el material biológico es cribado para evaluar las sustancias bioactivas. En un ejemplo, las células se acoplan a un sustrato de tal forma que pueden medirse los cambios electrofisiológicos en las células en respuesta a estímulos externos, por ejemplo, para su uso en un cribado de alto rendimiento de sustancias bioactivas. Las células también pueden ser transfectadas con un ADN que se dirige, expresa o inactiva genes específicos o productos génicos en la célula. Y proporcionando dichas células montadas en un chip acopladas a dispositivos de medición, tales como un ordenador, pueden cribarse rápidamente y de forma precisa muchos compuestos. Las células o los chips también podrían acoplarse al dispositivo de medición en matrices para un cribado paralelo a gran escala.
- 10 **[0125]** Los procedimientos de ensayo de la presente invención pueden estar en un formato de laboratorio convencional o adaptados para un alto rendimiento. El término "alto rendimiento" (HTS) se refiere a un diseño de ensayo que permite el análisis fácil de múltiples muestras simultáneamente, y tiene capacidad para una manipulación robótica. Otra característica deseada de los ensayos de alto rendimiento es un diseño de ensayo que está optimizado para reducir el uso de reactivos o para minimizar el número de manipulaciones con objeto de conseguir el análisis deseado.
- 15 **[0126]** En otra forma de realización preferida, el procedimiento de la presente invención comprende la realización de 2, 3, 4, 5, 7, 10 o más mediciones, opcionalmente en posiciones diferentes de la matriz. En una forma de realización de los procedimientos de cribado de la presente invención, se añade a la muestra o al medio de cultivo un compuesto conocido por activar o inhibir el proceso de diferenciación y/o la formación de estructuras tisulares, por ejemplo, ácido retinoico; para los compuestos apropiados, véase también *supra*.
- 20 **[0127]** Adicionalmente, los procedimientos descritos anteriormente también pueden combinarse, por supuesto, con una o más etapas de cualquiera de los procedimientos de cribado descritos anteriormente o con otros procedimientos de cribado bien conocidos en la materia. Algunos procedimientos para el descubrimiento de compuestos clínicos comprenden, por ejemplo, un cribado de rendimiento ultra-alto (Sundberg, Curr. Opin. Biotechnol. 11 (2000), 47-53) para la identificación del original, y un diseño farmacológico basado en la estructura (Verlind y Hol, Structure 2 (1994), 577-587) y en la química combinatoria (Salemme et al., Structure 15 (1997), 319-324) para la optimización del original. Una vez que se ha seleccionado un fármaco, el procedimiento puede tener la etapa adicional de repetir el procedimiento usado para llevar a cabo el diseño racional del fármaco mediante el uso del fármaco modificado y para evaluar si dicha muestra de fármaco modificado muestra una mejor afinidad según, por ejemplo, un análisis de interacción/energía. El procedimiento de la presente invención puede repetirse una o más veces de forma que la diversidad de dicha colección de compuestos se reduzca sucesivamente. Las sustancias son metabolizadas después de su administración *in vivo* con objeto de ser eliminadas bien mediante la excreción o bien mediante el metabolismo hacia uno o más metabolitos inactivos (Meyer, J. Pharmacokinat. Biopharm. 24 (1996), 449-459). Por lo tanto, en lugar de usar el compuesto real o el fármaco identificado y obtenido según los procedimientos de la presente invención, puede usarse una correspondiente formulación como profármaco que se convierte en su forma activa en el paciente mediante su metabolismo. Las medidas de precaución que pueden tomarse para la aplicación de profármacos y de fármacos se describen en la bibliografía; véase, para una revisión, Ozama, J. Toxicol. Sci. 21 (1996), 323-329.
- 30 **[0128]** Adicionalmente, la presente solicitud describe el uso de un compuesto identificado, aislado y/o producido mediante cualquiera de estos procedimientos para la preparación de una composición para el tratamiento de trastornos relacionados, por ejemplo, con tejido lesionado o tejido aberrante o la formación de órganos, insuficiencia cardiaca, etc.; véase también *supra*. Preferiblemente, el compuesto aislado o el correspondiente fármaco ayuda en la curación de heridas y/o en la curación del tejido lesionado. Como un procedimiento para el tratamiento de la sustancia identificada o de la composición que la contiene, puede administrarse a un sujeto que padece dicho trastorno. Los compuestos identificados, aislados y/o producidos mediante el procedimiento descrito anteriormente también pueden usarse como compuestos originales en el descubrimiento de fármacos y en la preparación de fármacos o de profármacos. Esto implica habitualmente la modificación del compuesto original o de un derivado del mismo o de un compuesto aislado, según se ha descrito anteriormente en el presente documento, tal como la modificación de dicha sustancia para alterar, eliminar y/o derivatizar una porción de la misma sospechosa de causar toxicidad, para aumentar la biodisponibilidad, la solubilidad y/o la semivida. El procedimiento puede comprender adicionalmente la mezcla de la sustancia aislada o modificada con un portador farmacéuticamente aceptable. Las diversas etapas mencionadas anteriormente son conocidas de forma general en la materia. Por ejemplo, hay disponibles programas informáticos para la implementación de estas técnicas; por ejemplo, Rein, Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions (Alan Liss, Nueva York, 1989). Los procedimientos para la preparación de derivados y análogos químicos son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer edición Nueva York Inc., 175 Fifth Avenue, Nueva York, N. Y. 10010 Estados Unidos, y en Organic Synthesis, Wiley, Nueva York, Estados Unidos.
- 45 **[0128]** Adicionalmente, pueden usarse peptidomiméticos y/o un diseño asistido por ordenador de los derivados y los análogos apropiados, por ejemplo, según los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos para la generación del original en el descubrimiento de fármacos también incluyen el uso de proteínas y de procedimientos de detección tales como la espectrometría de masas (Cheng et al., J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), 8859-8860) y algunos procedimientos de resonancia magnética (RMN) (Fejzo et al., Chem. Biol. 6 (1999), 755-769; Lin et al., J. Org. Chem. 62 (1997), 8930-8931). También pueden incluir o basarse en unos análisis de la relación cuantitativa
- 50 **[0128]** Adicionalmente, pueden usarse peptidomiméticos y/o un diseño asistido por ordenador de los derivados y los análogos apropiados, por ejemplo, según los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos para la generación del original en el descubrimiento de fármacos también incluyen el uso de proteínas y de procedimientos de detección tales como la espectrometría de masas (Cheng et al., J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), 8859-8860) y algunos procedimientos de resonancia magnética (RMN) (Fejzo et al., Chem. Biol. 6 (1999), 755-769; Lin et al., J. Org. Chem. 62 (1997), 8930-8931). También pueden incluir o basarse en unos análisis de la relación cuantitativa
- 55 **[0128]** Adicionalmente, pueden usarse peptidomiméticos y/o un diseño asistido por ordenador de los derivados y los análogos apropiados, por ejemplo, según los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos para la generación del original en el descubrimiento de fármacos también incluyen el uso de proteínas y de procedimientos de detección tales como la espectrometría de masas (Cheng et al., J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), 8859-8860) y algunos procedimientos de resonancia magnética (RMN) (Fejzo et al., Chem. Biol. 6 (1999), 755-769; Lin et al., J. Org. Chem. 62 (1997), 8930-8931). También pueden incluir o basarse en unos análisis de la relación cuantitativa
- 60 **[0128]** Adicionalmente, pueden usarse peptidomiméticos y/o un diseño asistido por ordenador de los derivados y los análogos apropiados, por ejemplo, según los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos para la generación del original en el descubrimiento de fármacos también incluyen el uso de proteínas y de procedimientos de detección tales como la espectrometría de masas (Cheng et al., J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), 8859-8860) y algunos procedimientos de resonancia magnética (RMN) (Fejzo et al., Chem. Biol. 6 (1999), 755-769; Lin et al., J. Org. Chem. 62 (1997), 8930-8931). También pueden incluir o basarse en unos análisis de la relación cuantitativa
- 65 **[0128]** Adicionalmente, pueden usarse peptidomiméticos y/o un diseño asistido por ordenador de los derivados y los análogos apropiados, por ejemplo, según los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos para la generación del original en el descubrimiento de fármacos también incluyen el uso de proteínas y de procedimientos de detección tales como la espectrometría de masas (Cheng et al., J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), 8859-8860) y algunos procedimientos de resonancia magnética (RMN) (Fejzo et al., Chem. Biol. 6 (1999), 755-769; Lin et al., J. Org. Chem. 62 (1997), 8930-8931). También pueden incluir o basarse en unos análisis de la relación cuantitativa

entre estructura y acción (QSAR) (Kubinyi, J. Med. Chem. 41 (1993), 2553-2564, Kubinyi, Pharm. Unserer Zeit 23 (1994), 281-290) bioquímica combinatoria, química clásica y otras (véase, por ejemplo, Holzgrabe y Bechtold, Pharm. Acta Helv. 74 (2000), 149-155). Adicionalmente, algunos ejemplos de portadores y de procedimientos de formulación pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences.

5

[0129] Una vez que se ha seleccionado un fármaco según uno cualquiera de los anteriormente descritos procedimientos de la presente invención, puede sintetizarse el fármaco o un profármaco del mismo en una cantidad terapéuticamente eficaz. Según se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de fármaco o de profármaco que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, es decir, un tratamiento, una curación, una prevención o una mejora del tejido lesionado, o un aumento en la velocidad del tratamiento, la curación, la prevención o la mejora de dichas afecciones. Además, o como alternativa, en particular con respecto a las pruebas preclínicas del fármaco, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye la cantidad total de fármaco o de profármaco que es suficiente para desencadenar una respuesta fisiológica en un animal de prueba no humano.

10

[0130] La sustancia aislada o modificada puede mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de portadores y de procedimientos de formulación pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences.

15

[0131] Como se ha mencionado anteriormente, los procedimientos y los ensayos de la presente invención pueden usarse para pruebas toxicológicas, embriotóxicas, mutágenas y/o teratógenas *in vitro*; véase *supra*. Otro aspecto importante descrito en este documento es, por lo tanto, un procedimiento de determinación de la toxicidad, preferentemente de la teratogenia, de la embriotoxicidad, de la toxicidad crónica o aguda de un compuesto que comprende las etapas de los procedimientos descritos en este documento.

20

[0132] Los ensayos pueden ser simples ensayos de "si/no" para determinar si hay un cambio sensible en comparación con un control. El compuesto de prueba o una pluralidad de compuestos de prueba también pueden someterse a la célula de prueba, preferentemente un cuerpo embrioide a diferentes concentraciones o series de dilución, preferentemente a unas dosis que se corresponden con los niveles fisiológicos de los correspondientes tipos de compuestos de prueba. Por lo tanto, también es posible generar fácilmente perfiles del compuesto con un propósito similar al descrito en el documento WO00/34525. Por ejemplo, pueden usarse dos o más ensayos y/o pueden evaluarse parámetros. Esos ensayos/parámetros pueden ser llevados a cabo/evaluados en paralelo o subsiguientemente; o pueden compararse los resultados de un ensayo con los resultados de un ensayo correspondiente llevado a cabo en otra parte. Por lo tanto, puede establecerse un perfil molecular de una composición química de prueba mediante la detección de las alteraciones en la "actividad eléctrica", por ejemplo, en cuerpos embrioides que están en contacto con la composición química de prueba, según se ha descrito en las secciones previas. Una vez que se ha determinado el perfil molecular de la composición de prueba, puede compararse con el de una composición química con unas toxicidades predeterminadas o, preferentemente, con una colección de perfiles moleculares de composiciones químicas con unas toxicidades predeterminadas. El resultado de dicha comparación proporciona información para que se pueda predecir la probabilidad de que la composición de prueba sea tóxica, qué tipo de toxicidad y lo tóxica que sería si se compara con otras composiciones tóxicas conocidas.

25

[0133] Las predicciones de la toxicidad de la composición de prueba basadas en sus perfiles moleculares en células ME, tejido, etc., preferentemente en células CE, no tienen que ser precisas al 100 %. Para que tengan un importante impacto positivo sobre la eficacia y los costes del desarrollo de fármacos, solo se tiene que aumentar modestamente la probabilidad de que los fármacos candidatos menos tóxicos, y por lo tanto, los más exitosos estén, por ejemplo, en la mitad superior de una lista priorizada de nuevos originales de fármacos.

30

[0134] Dado que las células y el tejido obtenidos según la presente invención se asemejan más estrechamente a la situación *in vivo* en comparación con los ensayos convencionales basados en células, se espera que los resultados obtenidos mediante los ensayos de la presente invención se correlacionen también con la teratogenia o la embriotoxicidad *in vivo* de los compuestos probados.

35

[0135] Pueden combinarse numerosas sustancias de prueba y añadirse bien simultáneamente o bien secuencialmente para recoger información sobre los posibles efectos potenciadores o inactivadores. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere al procedimiento descrito previamente, en el que dicha etapa de concentración incluye adicionalmente poner en contacto dicha muestra de prueba con al menos una segunda sustancia de prueba en presencia de dicha primera sustancia de prueba. Dos o más sustancias probadas en combinación proporcionarán información sobre su interacción en general.

40

[0136] Una forma de realización preferida de los procedimientos según la presente invención implica la adición al medio de cultivo de un compuesto conocido por activar o inhibir el proceso de diferenciación, particularmente si la sustancia de prueba es un agente terapéutico o una mezcla de los mismos. Este cribado puede realizarse, por ejemplo, bien porque se sabe que el compuesto tiene un efecto sobre la diferenciación de ciertos tipos celulares y se prueba para determinar su potencial para guiar la diferenciación de otros tipos celulares, o bien

45

50

55

60

65

porque un compuesto diseñado para que tenga efectos en cualquier parte puede tener efectos secundarios no deseados. El último aspecto se aplica particularmente a los agentes terapéuticos.

[0137] La presente invención también se refiere al uso de composiciones en kit que contienen unos activos
5 específicos, tales como los descritos anteriormente en este documento, útiles para la realización de uno cualquiera de los anteriormente descritos procedimientos de la presente invención, que contienen el vector o la composición de vectores descritos anteriormente en este documento, células multi- o pluripotentes; y opcionalmente medio de cultivo, moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, compuestos patrón, etc. Dicho kit comprendería normalmente un portador compartimentalizado adecuado para contener en estrecho confinamiento al menos un recipiente. El
10 portador comprendería adicionalmente los reactivos útiles para la realización de dichos procedimientos. El portador también puede contener un medio para la detección, tal como sustratos marcados con enzimas o similares.

[0138] Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de un chip que comprende una matriz de
15 electrodos según se ha definido anteriormente en el presente documento. En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención se refiere al uso de matrices y de chips que comprenden un soporte sólido y, unidas al mismo o suspendidas en el mismo, células, agregados de células o tejido obtenido mediante el procedimiento de la presente invención, que está en el proceso de diferenciación. Dichas matrices consisten generalmente en un sustrato de vidrio, de plástico o de silicio sobre el cual se depositan los agregados de células de prueba o los tejidos con un patrón particular. Dependiendo del tipo de matriz, éstas podrían estar adicionalmente
20 cubiertas por un conductor, por ejemplo, oro, platino, óxido de indio y estaño, iridio, etc., que permite una medición directa mediante el empleo de la conductividad de las células. El uso de dichas micromatrices de electrodos planas para células cultivadas y agregados celulares como biosensores es de particular interés.

[0139] Preferiblemente, el chip de la presente invención se caracteriza por la presencia de cuerpos
25 embrioides o de cardiomiocitos obtenibles mediante los procedimientos de la presente invención descritos en este documento e ilustrados en los Ejemplos. En una forma de realización preferida en particular, el chip de la presente invención comprende cardiocuerpos, es decir, tejidos de tipo cardíaco que incluyen cardiomiocitos atriales y ventriculares, así como células marcapasos. En una forma de realización preferida en particular, dicho chip comprende una superficie según se ilustra en la Figura 1.

[0140] Además, la presente invención se refiere al uso de un aparato para su uso en los procedimientos y en
los ensayos de la presente invención descritos en este documento. Por ejemplo, un aparato para la medición del potencial de la célula que tiene una pluralidad de microelectrodos y que puede ser usado y/o adaptado según las enseñanzas de la presente invención se describe en la solicitud de patente europea EP 0 689 051 A3.

[0141] Adicionalmente, la solicitud que internacional WO98/54294 describe un aparato y un procedimiento
para la monitorización de células y un procedimiento para la monitorización de los cambios en las células tras la adición de un analito en el entorno de la célula, que comprende un dispositivo que incluye una matriz de microelectrodos dispuesta en una cámara de cultivo de células, matriz en la que una porción de las células se
40 adhiere a las superficies de los microelectrodos. El diámetro de las células es mayor que los diámetros de los microelectrodos. Se aplica una señal de voltaje a través de cada uno de los microelectrodos y de un electrodo de referencia. La detección y la monitorización de las señales resultantes de la aplicación de la señal de voltaje proporciona información relativa a las características eléctricas de las células individuales, incluyendo la impedancia (la combinación de la capacitancia y la conductancia de la membrana celular), los parámetros del potencial de
45 acción, la capacitancia de la membrana celular, la conductancia de la membrana celular y la resistencia del sellado de la célula/sustrato.

[0142] Algunos medios y procedimientos adicionales que pueden ser implementados según las enseñanzas
de la presente invención pueden encontrarse en la bibliografía, véase, por ejemplo, Egert et al., Brain Res. Brain
50 Res. Protoc. 2 (1998), 229-242; Duport et al., Biosens. Bioelectron. 14 (1999), 369-376 y la solicitud de patente alemana DE 195 29 371 A1.

[0143] Por lo tanto, los medios y los procedimientos de la presente invención descritos anteriormente en este
documento pueden usarse en una diversidad de aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, ensayos de
55 "pérdida de función" con células ME que contienen mutaciones homocigotas de genes específicos, ensayos de "ganancia de función" con células ME que sobre expresan genes exógenos, el análisis del desarrollo de compuestos teratógenos/embriotóxicos *in vitro*, ensayos farmacológicos y el establecimiento de sistemas de modelo para las funciones celulares patológicas, y la aplicación de la diferenciación y de los factores de crecimiento para la inducción de células diferenciadas selectivamente que pueden usarse como fuente para injertos tisulares; véase, para una
60 revisión, por ejemplo, Guan et al., Altex 16 (1999), 135-141.

[0144] Utilizando los procedimientos descritos anteriormente se determina la identidad de un fármaco. Los
agentes se identifican por su capacidad para alterar ciertos parámetros, tales como los descritos anteriormente en este documento, por ejemplo, los descritos para las MEA. Para la identificación de compuestos originales
65 adecuados, puede realizarse una caracterización terapéutica adicional del agente, o de análogos del mismo, para evaluar la eficacia y la toxicidad en animales. Aquellos compuestos que tengan unos perfiles terapéuticos después

de las pruebas con animales pueden ser formulados en preparaciones farmacéuticas para su uso en seres humanos o para usos veterinarios. La presente solicitud también describe fármacos identificados según los procedimientos y los ensayos descritos anteriormente, así como composiciones farmacéuticas para su uso en terapia que comprenden dicho fármaco.

5

[0145] El fármaco puede ser combinado con diluyentes o portadores adecuados, preferentemente aquellos que son farmacéuticamente aceptables. Algunos ejemplos de dichos portadores, diluyentes y procedimientos de formulación pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences. Para formar una composición farmacéuticamente aceptable y adecuada para su administración eficaz, dichas composiciones contendrán una cantidad eficaz del modulador. Los portadores o diluyentes son habitualmente estériles y no tóxicos, y se definen como los vehículos usados habitualmente para la formulación de composiciones farmacéuticas para su administración a animales o a seres humanos. El diluyente se selecciona de forma que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Algunos ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o la formulación farmacéutica puede incluir también otros portadores, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunógenos, y similares. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de modulador que es suficiente para conseguir el efecto deseado sobre la diferenciación de las células objetivo. Algunos ejemplos adicionales de portadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la materia e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, emulsiones, como en forma de emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Las composiciones que comprenden dichos portadores pueden ser formuladas mediante procedimientos convencionales bien conocidos. Consecuentemente, la presente invención también proporciona un procedimiento para la elaboración de una composición farmacéutica para su uso en la modulación de la diferenciación celular que comprende la mezcla de un modulador de la diferenciación celular identificado según un procedimiento de la invención con un diluyente o portador adecuado.

25

[0146] Estas y otras formas de realización son descritas y están englobadas por la descripción y los ejemplos de la presente invención. La bibliografía adicional concerniente a uno cualquiera de los materiales, los procedimientos, los usos y los compuestos que se van a emplear según la presente invención, puede recuperarse a partir de bibliotecas y de bases de datos públicas, usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública "Medline", que es alojada por el National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine del National Institutes of Health. Algunas bases de datos y direcciones web adicionales, tales como las del European Bioinformatics Institute (CEI), que es parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL), son conocidas por la persona experta en la materia y también pueden obtenerse usando motores de búsqueda en internet. Un resumen sobre la información de patentes de biotecnología y un sondeo de las fuentes relevantes de información patente útil para la investigación retrospectiva y para el conocimiento actual se proporciona en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

30

[0147] La anterior descripción describe de forma general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa mediante la referencia a los siguientes ejemplos específicos y a las figuras que se proporcionan en este documento, únicamente con un propósito ilustrativo y que no pretenden limitar el ámbito de la invención.

35

[0148] La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivos celulares, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están en la pericia de la técnica. Para una elaboración adicional de las técnicas generales y relativas a la tecnología de células madre, el profesional puede referirse a los libros de texto y las revisiones convencionales, por ejemplo, *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach* (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); *Guide to Techniques in Mouse Development* (P. M. Wasserman et al., eds., Academic Press 1993); *Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro* (Wiles, Meth. Enzymol. 225 (1993), 900); *Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (Rathjen et al., *Reprod. Fertil. Dev.* 10 (1998), 31.). La diferenciación de las células madre se revisa en Robertson, *Meth. Cell Biol.* 75 (1997), 173; y en Pedersen, *Reprod. Fertil. Dev.* 10 (1998), 31. Aparte de las fuentes de las células madre ya descritas anteriormente, se proporcionan referencias adicionales; véase Evans y Kaufman, *Nature* 292 (1981), 154-156; Handyside et al., *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196 (1987), 185-190; Flechon et al., *J. Reprod. Fertil. Abstract Series* 6 (1990), 25; Doetschman et al., *Dev. Biol.* 127 (1988), 224-227; Evans et al., *Theriogenology* 33 (1990), 125-128; Notarianni et al., *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 43 (1991), 255-260; Giles et al., *Biol. Reprod.* 44 (Supl. 1) (1991), 57; Strelchenko et al., *Theriogenology* 35 (1991), 274; Sukoyan et al., *Mol. Reprod. Dev.* 93 (1992), 418-431; Iannaccone et al., *Dev. Biol.* 163 (1994), 288-292. Los procedimientos de genética molecular y de ingeniería genética se describen de forma general en las ediciones actuales de *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller & Calos, eds.); *Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edición (F. M. Ausubel et al., eds.); y *Recombinant DNA Methodology* (R. Wu ed., Academic Press). *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory);

60

65

Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986). Los reactivos, los vectores de clonación y los kits para la manipulación genética que se mencionan en esta descripción están disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen y ClonTech. Las técnicas generales de cultivos celulares y de recolección de medios se esquematizan en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: protocolo de diferenciación para células ME para la preparación de cardiomiocitos ventriculares y el registro de la MEA

[0149] Para la diferenciación de las células ME en cardiomiocitos ventriculares, se cultivaron células ME de la línea celular R1 (véase *supra* y, por ejemplo, Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90 (1993), 8424-8428) en placas de Petri de 10 cm en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con un 15 % de suero bovino fetal (FCS) y con factor inhibidor de la leucemia (LIF) en una capa de células alimentadoras (fibroblastos embrionarios de ratón irradiados). Las células se incubaron a 37 °C, un 7 % de CO₂ y una humedad del 95 %.

Día 0: las células se tripsinizaron en una suspensión de células individuales y se recogieron mediante una centrifugación. Las células se resuspendieron hasta una densidad de aproximadamente 2 x 10⁶ células por ml en medio KnockOut (KO) complementado con un 15 % de sustitución de suero (SR). Se incubaron placas de Petri de 4 ml por 6 cm de esta suspensión en una mesa oscilante a 50 rpm, a 37 °C, un 5 % de CO₂ y una humedad del 95 % durante el día siguiente;

Día 1: dilución de los agregados de células ME (cuerpos embrionarios; CE) en medio KO complementado con un 15 % de SR hasta una densidad de 2.000 CE/10 ml y una incubación adicional;

Día 3: cambio del medio (MW) por medio KO complementado con un 15 % de SR;

Día 4: MW en medio de Iscove complementado con un 20 % de FCS;

Día 5: MW en medio de Iscove complementado con un 20 % de FCS;

Día 6: MW en medio KO complementado con un 15 % de SR;

Día 7: para el uso de los CE en el ensayo de MEA de la invención, se colocaron los CE en placas en 100 µl de medio de Iscove complementado con un 15 % de FCS con 1 CE por área de cultivo y se precintaron con un cierre de polidimetilsilano (PDMS) y se usaron para el ensayo a partir del Día 10 en adelante.

[0150] Para la preparación del tejido cardíaco para el ensayo, se sometieron las células ME recombinantes, que expresan el gen de resistencia a la puromicina bajo el control de promotores específicos cardíacos (alfa MHC para las células atriales y marcapasos o para las células RLC-2v ventriculares), el Día 9, a 2 µg de puromicina/ml y se incubaron durante tres días adicionales. Después de la disociación de las células con colagenasa el Día 12, las células cardíacas se mezclaron con fibroblastos embrionarios en una proporción de 1:1 y se sembraron en la multimatriz de electrodos a una densidad de 3 x 10⁵ células por cm². Después de los tres días siguientes se desarrolla un tejido de tipo cardíaco que puede ser analizado con el ensayo multielectrodo de la invención. Por ejemplo, pueden usarse MEA planas integradas en el sustrato (Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemania) para los registros a largo plazo de la actividad eléctrica espontánea de los cultivos de los miocitos cardíacos y de los CE; véase también Egert et al., (1998) y Banach et al., (2003), y las referencias citadas en los mismos. Los CE pueden estar colocados en la zona media de una MEA esterilizada que consiste en 60 electrodos de nitruro de titanio recubiertos con oro (Ø = 30 µm; distancia entre los electrodos 200 µm en una rejilla cuadrada). Para el registro puede insertarse temporalmente un electrodo de Ag/AgCl estéril individual en la placa como electrodo de tierra. La MEA puede ser conectada al amplificador y al sistema de adquisición de datos (Multi Channel System, Reutlingen, Alemania), que incluye un dispositivo de calentamiento para mantener una temperatura constante de 37 °C. Los datos pueden ser registrados simultáneamente a partir de los 60 canales (frecuencia de muestreo de hasta 40 kHz) en unas condiciones estériles. Los datos pueden ser analizados sin conexión con un conjunto de herramientas personalizado programado para MATLAB (The Mathworks, Natick, MA, Estados Unidos) para detectar los potenciales de campo.

Ejemplo 2: registro extracelular de los potenciales de acción de campo (fAP) de los cardiomiocitos purificados

[0151] Según los procedimientos descritos en las solicitudes internacionales WO2004/113515 y WO2005/005621 que incorporan la descripción de las solicitudes internacionales WO02/051987 y WO99/01552, las células atriales positivas para la GEFP y marcapasos cardíacas pueden derivar de células madre que han sido modificadas genéticamente con un gen recombinante de la GFP bajo el control de promotores selectivos y que portan el gen de resistencia a la puromicina; véase, por ejemplo, Kolossov et al., FASCE J. 19 (2005), 577-579. Después de un cultivo en masa según se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO2005/005621, que

- comprende diez placas de cultivo de 12 x 12 cm² con aproximadamente 4.000 CE/20 ml y un cambio del medio (IMDM + 20 % de FCS) cada segundo o tercer día, respectivamente, a través de tamices celulares con una membrana de nailon, y una selección con puromicina durante 9-14 días, los CE resultantes se transfieren a tubos de 50 ml y se lavan dos veces con PBS. Después de un tratamiento con tripsina durante 10 minutos pipeteando dos veces con una pipeta de 1 ml, se consigue una disociación casi perfecta, aproximadamente 1,5 x 10⁶ células verdes. Las células disociadas se colocan en placas recubiertas con fibronectina y el medio se cambia al día siguiente, es decir, el día 15 después del cultivo, eliminando así la mayor parte de los desechos celulares y las células muertas.
- 5 **[0152]** Para colocar en placas las MEA, las células cardíacas resultantes se lavan dos veces con PBS enfriado en hielo con Ca²⁺/Mg²⁺. A continuación, las células se incuban en hielo durante 30 minutos y se lavan dos veces con PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺. La tripsinización es seguida por 5 minutos a 37 °C, lo que da como resultado aproximadamente 8 x 10⁵ células positivas para la GEFP.
- 10 **[0153]** Después, las células se colocan en placas de MEA recubiertas con fibronectina (3,3 x 10⁵ células cardíacas positivas para la GEFP). A este respecto, las MEA se limpiaron con plasma y se recubrieron con fibronectina placentaria bovina durante aproximadamente 4 horas a 4 °C. La fibronectina residual fue aspirada y las MEA se secaron en plataformas limpias.
- 15 **[0154]** Las células atriales y de marcapasos seleccionadas, disociadas y recolocadas en placas de MEA recubiertas con fibronectina pueden usarse para un análisis tanto agudo como a largo plazo a nivel individual o en total por medio del registro de los microelectrodos integrados en el sustrato.
- 20 **[0155]** En otro experimento se generaron cardiomiocitos ventriculares a partir de CE derivados de la línea de células madre embrionarias de ratón D3 (véase Doetschman et al., 1985, 1988), *supra*, que se transfectaron con una construcción que comprende los casetes de expresión de la resistencia a la puromicina y de la GEFP bajo el control del promotor murino MLC2v (RPLC2v, número de registro del banco de genes nº AF302688) basada en el vector parental pIRES2-GEFP (Clontech).
- 25 **[0156]** Para establecer el cultivo en masa, estas células ME modificadas genéticamente se tripsinizan, se siembran a 2 x 10⁵ células/ml en KO-DMEM + 15 % de SR y se cultivan en suspensión en un agitador. El día 4, los CE resultantes se colocan en placas con entre 500 y 2.000 CE por placa de cultivo celular de 15 cm con un recubrimiento de gelatina (20 placas).
En el día 11 se añaden 0,4 µl/ml de puromicina a las placas de cultivo celular, y al día siguiente el medio es intercambiado y se añade otro 1 µl/ml de puromicina. En el día 14 las células se combinan y se tripsinizan. A partir de estas células, se colocaron en placas 1,1 x 10⁵ positivas para la GEFP en una placa con fibronectina de 6 cm con puromicina (0,4 µl/ml), dando como resultado aproximadamente 27 cardiomiocitos ventriculares por CE. En el día 17, las células ventriculares se tripsinizan y se colocan en placas en MEA, produciendo 6 x 10⁴ células purificadas que se corresponden con aproximadamente 15 cardiomiocitos ventriculares/CE.
- 30 **[0157]** Los registros de la MEA pueden llevarse a cabo a partir de la monocapa de cardiomiocitos ventriculares purificados 1, 2 y 7 días después de la colocación en las placas de MEA. Según la presente invención, pudo demostrarse que los registros procedentes de los electrodos seleccionados reflejan las típicas duraciones largas en los potenciales de acción de campo (fAPD), según se esperaba para los cardiomiocitos ventriculares.
- 35 **[0158]** Según se ha descrito anteriormente, los cardiomiocitos purificados derivados de células ME también pueden sembrarse a una densidad más baja (5 x 10⁴ células por MEA) y pueden realizarse unos análisis de las células individuales de estas células que laten de forma autónoma, por ejemplo, mediante la obtención de imágenes por luz de transmisión y fluorescencia, y con los registros de las células individuales en los electrodos de la MEA.
- 40 **[0159]** Tomados conjuntamente, pudo demostrarse, según la presente invención, que el tejido y las células diferenciadas *in vitro* derivadas de células ME, junto con la técnica de micromatriz de electrodos, pueden usarse para pruebas de toxicidad cuantitativas y cualitativas y para la evaluación de fármacos. Según se describe en los ejemplos, preferentemente pueden usarse o seleccionarse, disociarse y recolocarse en placas tanto cuerpos embrioides como las células diferenciadas derivadas de los mismos, dependiendo de los parámetros que se van a probar. En resumen, se proporciona un sistema de ensayo tisular y celular funcional no invasivo *in vitro*.
- 45 **[0159]**
- 50
- 55

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de ensayo tisular y celular funcional *in vitro* para la obtención y/o la caracterización de un compuesto de interés que comprende:
- 5 (a) cultivar un material biológico que comprende células, un agregado de células, un tejido o un órgano, en una matriz de electrodos;
- (b) someter dicho material biológico a una sustancia de prueba; y
- (c) medir la actividad eléctrica de dicho material biológico a través de dicha matriz de electrodos, y analizar uno
- 10 cualquiera de, o todos, los siguientes parámetros:
- (i) canales de Na⁺;
- (ii) canales de Ca²⁺/K⁺;
- (iii) canales de K⁺;
- 15 (iv) amplitud y/o duración del potencial de campo (FDP),
- (v) cronotropía de las células cardíacas o de los periodos de ráfagas de las células neuronales;
- (vi) arritmias, fenómenos de tipo EAD;
- (vii) valor del pH;
- (viii) presión parcial de oxígeno (pO₂);
- 20 (ix) parada cardíaca; y/o
- (x) análisis de la disociación de la contractilidad AV, de los efectos del NO y/o de los cambios morfológicos.
- en el que dichas células, agregado de células, tejido y órgano se obtienen a partir de células madre que están alteradas genéticamente para que comprendan un marcador seleccionable unido operativamente a una primera
- 25 secuencia reguladora específica del tipo celular específica para el primer tipo celular, y células diferenciadas y empobrecidas en los tipos celulares relativamente indiferenciados y/o en los no deseados mediante el uso de un sistema de selección que es letal para las células y los tipos celulares no deseados, mediante la expresión de un gen marcador seleccionable que hace que las células del tipo celular específico sean resistentes al efecto letal.
- 30 2. Ensayo de la reivindicación 1, en el que dichas células madre son células madre embrionarias (ME).
3. Ensayo de la reivindicación 2, en el que dicho material biológico es un tejido o estructuras de tipo tejido obtenidos a partir del cultivo de un primer tipo celular derivado de una célula ME, en presencia de al menos un segundo tipo celular embrionario.
- 35 4. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho marcador seleccionable confiere resistencia a la puomicina, a la neomicina o a la higromicina.
5. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en el que dicha célula madre embrionaria de dicho primer
- 40 tipo celular derivado de dicha célula madre embrionaria comprende adicionalmente un gen indicador unido operativamente a una secuencia reguladora específica del tipo celular específica para dicho primer tipo celular.
6. Ensayo de la reivindicación 5, en el que dicha secuencia reguladora específica del tipo celular del gen indicador es sustancialmente la misma que dicha primera secuencia reguladora específica del tipo celular del gen marcador.
- 45 7. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho material biológico comprende cardiomiocitos.
8. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos agregados de células son cuerpos
- 50 embrioides (CE).
9. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha matriz de electrodos es una matriz de múltiples electrodos o microelectrodos (MEA),
- 55 10. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la matriz de electrodos está recubierta con fibronectina.
11. Ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se analiza al menos la cronotropía de las células cardíacas o la disociación de la contractilidad AV.
- 60 12. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el material biológico comprende cuerpos embrioides (CE), en el que los CE consisten en tejido cardíaco funcional que late de forma autónoma y cubre las propiedades electrofisiológicas de los cardiomiocitos atriales y/o ventriculares, así como de las células de marcapasos.
- 65 13. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el material biológico deriva total o

parcialmente de una línea de células ME murinas.

14. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho material biológico comprende una o más células que están modificadas genéticamente para que (sobre)expresen o inhiban la expresión de un gen diana.

5

15. Ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que se añade al medio de cultivo un compuesto conocido por activar o inhibir el proceso de diferenciación y/o la formación de la estructura tisular.

16. Uso de un kit para llevar a cabo un ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, conteniendo dicho kit un vector o una composición de vectores, una célula multipotente o pluripotente; y un medio de cultivo, moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, una matriz y/o compuestos patrón.

10

17. Uso de un chip que comprende una matriz de electrodos y células, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para llevar a cabo un ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

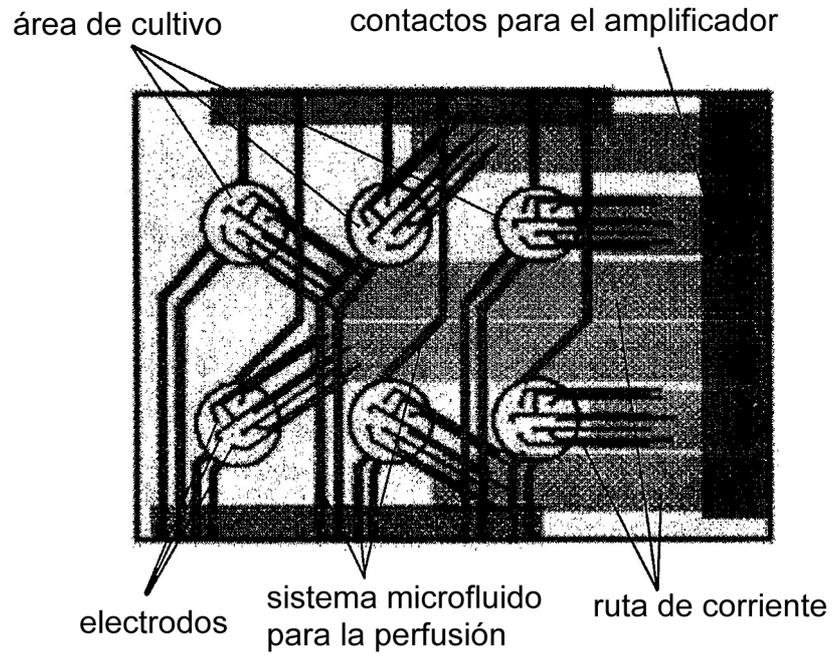
15

18. Uso de un aparato para el análisis de la matriz de electrodos en el ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

19. Uso de células madre, de agregados de células, de un tejido, de un vector o de una composición de vectores, de una matriz, de un aparato o de un chip en un ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

20

A



B

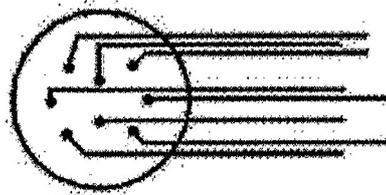


Fig. 1