



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 335 848**

⑫ Número de solicitud: 200802799

⑮ Int. Cl.:
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/30 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **02.10.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
05.04.2010

⑰ Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-CITT-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
Universidad Autónoma de Barcelona

⑱ Inventor/es: **Botana López, Luis M.;**
Giménez-Llort, Lydia y
Vale González, María del Carmen

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Composición celular *in vitro* con sobreexpresión simultánea de genes humanos mutados PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301L}.**

㉑ Resumen:
Composición celular *in vitro* con sobreexpresión simultánea de genes humanos mutados PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301L}. Composición que comprende cultivos primarios de neuronas corticales obtenibles a partir de embriones de ratones 3XTgAD cultivados en condiciones despolarizantes. Además, la invención se refiere a un método *in vitro* para evaluar la eficacia de compuestos y materiales para modificar, tratar o prevenir enfermedades relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP que comprende el empleo de cultivos primarios de neuronas corticales obtenibles a partir de embriones de ratones 3XTgAD cultivados en condiciones despolarizantes.

ES 2 335 848 A1

DESCRIPCIÓN

Composición celular *in vitro* con sobreexpresión simultánea de genes humanos mutados PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301L}.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un modelo *in vitro* obtenido a partir de ratones 3xTg-AD para la enfermedad de Alzheimer con sobreexpresión simultánea de PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301L} así como su utilidad para el estudio de las bases biológicas de la enfermedad de alzheimer y/o enfermedades relacionadas con patología tau y beta-amiloide y para la evaluación de terapias preventivas, terapéuticas y/o paliativas para esta enfermedad.

Estado de la técnica

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo, de origen todavía desconocido, y frente a la que no se puede, actualmente, ofrecer ningún tratamiento capaz de curarla o prevenirla. Afecta al 5-7% de las personas de más de sesenta y cinco años y es la causa de invalidez, dependencia y mortalidad más frecuente entre las personas de edad avanzada. Según los datos disponibles en la Fundación Alzheimer España (<http://www.fundacionalzheimeresp.org>) cerca de 700.000 personas están afectadas en España y se manifiestan más de 100.000 nuevos enfermos al año, lo que representa que más de dos millones de españoles y sus familiares, hoy en día, ven su vida trastornada por la enfermedad. Según las últimas estimaciones, 8 millones de europeos están afectados por la enfermedad de Alzheimer y además teniendo en cuenta el envejecimiento de la población se prevé que el número de enfermos se duplique en 2020 y triplique en 2050.

A nivel neuropatológico la EA se caracteriza por dos estructuras anormales que se acumulan en el cerebro: depósitos amiloides y placas neurofibrilares. Los depósitos amiloides son fibras extracelulares formadas por β -amiloide, (β A, concretamente β A40 y β A42), péptidos generados por la ruptura proteolítica de la proteína precursora de β -amiloide (APP). Las marañas neurofibrilares, en contraste, son filamentos intracelulares formados por la polimerización de tau, que normalmente funciona como proteína asociada a los microtúbulos en los axones neuronales. Aunque hoy en día, existe considerable debate acerca de si las fibras de β A y los filamentos de tau poseen toxicidad intrínseca o simplemente son resultado de otros procesos neurodegenerativos, numerosas evidencias confirman el papel de tau y β A en la neurodegeneración. A pesar de las investigaciones iniciales encaminadas a dilucidar el papel individual de tau y β A en la EA, los últimos estudios indican que la patología amiloide puede empeorar la patología tau y que no necesariamente los tratamientos que mejoran la patología amiloide mejoran también la patología tau, de ahí la necesidad de disponer de modelos para la enfermedad de alzheimer que presenten patología tau y β A de manera simultánea. La proteína precursora de beta-amiloide (APP) es una proteína transmembrana ampliamente conocida por su papel en la enfermedad de Alzheimer. En los cerebros de pacientes con EA las placas amiloides conteniendo agregados de beta-amiloide aparecen en regiones cerebrales específicas, desencadenando una respuesta inflamatoria, muerte neuronal y deterioro cognitivo progresivo. Uno de los mecanismos por los cuales el péptido beta-amiloide se genera a partir de APP es la ruptura de APP en una posición extracelular (sitio beta) seguido por una ruptura inusual dentro del segmento transmembrana de APP (sitio gamma), generando un fragmento de APP que contiene 39-43 aminoácidos. Varias mutaciones en la proteína APP han sido correlacionadas con la EA debido al incremento o alteración en la transformación de APP en beta-amiloide, en particular la transformación de APP a cantidades grandes de la forma larga de beta-amiloide (es decir beta-amiloide 40 y beta-amiloide 42). El péptido β -amiloide ha sido implicado además en defectos neuropatológicos en individuos con el síndrome de Down. Por ejemplo, prácticamente todos los individuos con síndrome de Down, que poseen una copia extra del cromosoma 21 muestran alteraciones neuropatológicas similares a las observadas en la enfermedad de alzheimer si sobreviven más allá de los 40 años y esto parece ser debido a una producción excesiva de β -amiloide, la cual está codificada por el gen de APP localizado en el cromosoma 21.

Durante los últimos años, los modelos animales para la enfermedad de Alzheimer han proporcionado oportunidades excelentes para profundizar en el conocimiento de la etiopatología y de las terapias para la enfermedad. Las principales características de la enfermedad de Alzheimer han sido reproducidas en diferentes modelos murinos obtenidos a partir de ratones transgénicos, obtenidos por ingeniería genética incorporando alguno de los transgenes que en humanos están presentes en los pocos casos (sólo un 10%) de Alzheimer de tipo familiar, principalmente modelos que sobreexpresan el gen APP que da lugar a la proteína precursora del β A. Sin embargo, ninguno de estos modelos había logrado aunar las principales características neuropatológicas, conductuales y neuroquímicas de la enfermedad de Alzheimer hasta que en el año 2003 el Profesor LaFerla desarrolló los ratones triple transgénicos 3xTgAD. Se ha demostrado que los ratones 3xTgAD, con transgenes humanos PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301L}, presentan los caracteres más sobresalientes de la EA y desarrollan, progresivamente, placas de β A y marañas neurofibrilares de Tau en un patrón temporal y neuroanatómico paralelo al de humanos. Además, presentan disfunción sináptica, deficiencias colinérgicas y conductuales, de forma dependiente a la edad pero iniciándose antes de la patología de placas y marañas, y los déficits en plasticidad sináptica a largo plazo correlacionan con la acumulación de β A a nivel intracelular. En base a todo ello, los ratones 3xTg-AD proporcionan un modelo animal único para estudiar la neurobiología de la enfermedad y evaluar estrategias preventivas y terapéuticas potenciales sobre ambos tipos de lesión (patología tau y beta-amiloide) y otras deficiencias celulares y moleculares presentes en la enfermedad de Alzheimer.

Uno de los mayores desafíos en las aproximaciones a la patogénesis de la EA es el desarrollo de modelos celulares adecuados en los que se reproduzcan determinados aspectos celulares, moleculares y bioquímicos de la EA en huma-

nos. A pesar de la proliferación y utilidad de modelos transgénicos *in vivo* para la EA, en todos ellos las alteraciones neuropatológicas de la EA no aparecen antes de los 2 meses de edad del animal. Esto conlleva que no se pueden realizar estudios de las bases neurobiológicas de la enfermedad ni evaluar sustancias preventivas y/o terapéuticas para la EA hasta una cierta edad del animal. Además, las aproximaciones *in vivo* son extremadamente costosas tanto en términos de tiempo como económicos debido al coste del mantenimiento de los animales, la muerte prematura y el número de animales que se necesitan para cada uno de estos estudios, etc por lo que el potencial preventivo y/o terapéutico de distintos tipos de estrategias para la EA que pueden tener enorme valor terapéutico, no pueden ser evaluadas mediante estos métodos.

10 Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un modelo celular *in vitro* para evaluar la eficacia de compuestos y materiales para modificar, tratar o prevenir enfermedades relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP que comprende el empleo de cultivos primarios de neuronas corticales obtenibles a partir de embriones de ratones 3xTgAD cultivados en condiciones despolarizantes.

Por “patologías relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP” se entiende cualquier enfermedad que curse con incremento en los agregados de proteína tau, y/o incremento de los niveles de beta-amiloide o proteína precursora de beta amiloide.

En una realización preferida de la invención los compuestos evaluados se seleccionan del grupo que consiste en péptidos, polipéptidos, proteínas, agentes biológicos o fármacos. En una realización más preferida de la presente invención la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer. En una realización aún más preferida de la presente invención la evaluación se lleva a cabo empleando métodos de HTS (*high through-put screening*). En aún otra realización de la invención los cultivos primarios de neuronas se obtienen a partir de embriones de ratones 3XTgAD cuya edad está comprendida entre 15-17 días.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición (de aquí en adelante composición de la presente invención) que comprende cultivos primarios de neuronas corticales obtenibles a partir de la corteza cerebral de embriones de ratones 3xTgAD de 15-17 días de gestación y que se mantienen en condiciones despolarizantes.

Los “ratones 3xTgAD” descritos en la presente invención se refieren a ratones triple transgénicos obtenibles mediante el procedimiento detallado en la solicitud internacional WO2003/053136 y proporcionados por los titulares de dicha solicitud.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método de preparación de la composición de la invención.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención para el estudio de las bases biológicas de enfermedades relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP. En una realización preferida de la presente invención, la composición de la invención se emplea para evaluar la eficacia de compuestos y materiales para modificar, tratar o prevenir enfermedades relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP. En un aspecto aún más preferido de la invención la composición la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

Descripción las figuras

La Figura 1 muestra una imagen de microscopía confocal en la que se representa la expresión de la proteína precursora de beta-amiloide (APP) en cultivos silvestres (A) y cultivos neocorticales obtenidos de animales triple transgénicos (B). A los 8 días en cultivo la expresión de APP está incrementada en cultivos primarios obtenidos de animales triple-transgénicos. Barra de escala 20 μ m.

La Figura 2 muestra una imagen de microscopía confocal en la que se representa la expresión de beta-amiloide en cultivos silvestres (A) y cultivos neocorticales obtenidos de animales triple transgénicos (B). A los 8 días en cultivo la expresión de β A está incrementada en cultivos primarios obtenidos de animales triple-transgénicos. Barra de escala 20 μ m.

La Figura 3 muestra una imagen de microscopía confocal en la que se representa la expresión de Tau 46 (tau total) en cultivos silvestres (A) y cultivos neocorticales obtenidos de animales triple transgénicos (B) después de 8 div. A los 8 días en cultivo la expresión de Tau total está incrementada en cultivos primarios obtenidos de animales triple-transgénicos. Barra de escala 20 μ m.

La Figura 4 muestra una imagen de microscopia confocal en la que se representa la expresión de Tau HT7 (residuos 159-163 de la proteína) en cultivos silvestres (A) y cultivos neocorticales obtenidos de animales triple transgénicos (B) después de 8 div. A los 8 días en cultivo la expresión de Tau está incrementada en cultivos primarios obtenidos de animales triple-transgénicos. Barra de escala 20 μ m.

La Figura 5 muestra una imagen de microscopia confocal en la que se representa la expresión de Tau AT8 (Tau fosforilada en Ser 202) en cultivos silvestres (A) y cultivos neocorticales obtenidos de animales triple transgénicos (B) después de 8 div. A los 8 días en cultivo la expresión de Tau fosforilada en Ser 202 está incrementada en cultivos primarios obtenidos de animales triple-transgénicos. Barra de escala 20 μ m.

La Figura 6 muestra una imagen de microscopia confocal en la que se representa la expresión de Tau AT100 (tau fosforilada en Thr 212 y Ser 214) en cultivos silvestres (A) y cultivos neocorticales obtenidos de animales triple transgénicos (B) después de 8 div. A los 8 días en cultivo la expresión de esta isoforma proteica está incrementada en cultivos primarios obtenidos de animales triple-transgénicos. Barra de escala 20 μ m.

La Figura 7 muestra una imagen de microscopia confocal en la que se representa la expresión de Tau AT270 (Tau fosforilada en Thr 181) en cultivos silvestres (A) y cultivos neocorticales obtenidos de animales triple transgénicos (B) después de 8 div. A los 8 días en cultivo la expresión de esta isoforma de la proteína está incrementada en cultivos primarios obtenidos de animales triple-transgénicos. Barra de escala 20 μ m.

La Figura 8 muestra una imagen de microscopía confocal en la que se representa la expresión de Tau 46 (tau total) en cultivos silvestres (A) y cultivos neocorticales obtenidos de embriones de animales triple transgénicos (B) después de 14 div. A los 14 días en cultivo la expresión de Tau total está incrementada en cultivos primarios obtenidos de animales triple-transgénicos. Barra de escala 20 μ m.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se enfrenta al problema técnico de encontrar una solución que solvante los problemas asociados a los modelos transgénicos *in vivo* para la EA que existen hoy en día.

En este sentido, la presente invención proporciona un modelo *in vitro* nuevo, rápido, eficaz y reproducible para estudiar las bases biológicas y evaluar terapias y compuestos para el tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer y/o enfermedades asociadas a Tau y β A basado en el empleo de una composición que comprende cultivos primarios de neuronas corticales obtenibles a partir de embriones de ratones 3xTgAD que se mantienen *in vitro* en condiciones despolarizantes.

Para explorar en profundidad las funciones celulares y propiedades de los productos génicos relacionados con la EA, los modelos celulares son indispensables. Por otra parte, aunque tanto astrocitos como neuronas producen niveles elevados de beta-amiloide, las neuronas son más drásticamente afectadas por la enfermedad. Por consiguiente el estudio de las células neuronales parece más relevante para comprender los aspectos moleculares o las cascadas patológicas causantes de la EA así como para iniciar el estudio de terapias preventivas y/o terapéuticas para la misma.

En el caso del los ratones 3xTgAD, los transgenes humanos PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{p301L} son expresados bajo el control del promotor Thy1.2 que dirige la expresión de los mismos predominantemente al sistema nervioso central, y se expresan ya en estadios embrionarios.

A pesar de que en embriones de ratones 3xTgAD la sobreexpresión de los transgenes humanos para PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{p301L} es 3 veces mayor que en embriones de ratones control, hasta el momento no se ha podido establecer un modelo *in vitro* con sobreexpresión de estos transgenes ya que la expresión del promotor Thy1.2 es demasiado baja en el embrión lo cual impide obtener sobreexpresión de los transgenes en condiciones habituales de cultivo de neuronas corticales. De hecho, hasta el momento la baja expresión del promotor Thy1.2 en el embrión, ha imposibilitado la obtención de un modelo neuronal *in vitro* obtenido a partir de células embrionarias. En el modelo descrito en la presente invención y en las condiciones de cultivo descritas, los transgenes humanos están activados en cultivos neuronales *in vitro* tal como se demuestra en la presente invención y además se sobreexpresan de forma dependiente del tiempo en cultivo, por lo tanto los cultivos neuronales primarios obtenidos de embriones de ratones 3xTgAD constituyen un modelo singular para la EA.

Las condiciones de cultivo indispensables para conseguir una expresión génica dependiente del tiempo son condiciones despolarizantes (KCl 10-25 mM) y elevada densidad de siembra (más de 2.800.000 células por ml).

Por ello, este modelo *in vitro* proporciona un modelo multidimensional único para estudiar las bases biológicas de la enfermedad y evaluar estrategias preventivas y/o terapéuticas para la EA ya que se ha demostrado que algunos tratamientos en modelos que sobreexpresan únicamente beta-amiloide o tau pueden mejorar una de las patologías y empeorar la otra (por ejemplo los tratamientos crónicos con nicotina mejoran los depósitos de β -amiloide pero empeoran las marañas neurofibrilares). Hasta la fecha no existe ningún modelo *in vitro* que reproduzca a nivel celular, molecular y funcional el espectro neuropatológico de la enfermedad de alzheimer que muestran los pacientes humanos.

Así, la invención propuesta describe un modelo *in vitro* para estudiar las bases biológicas de la EA y evaluar la eficacia de compuestos y materiales, tales como productos biológicos, fármacos y productos químicos o interacciones neuroquímicas resultantes de cultivos obtenidos a partir de animales híbridos, en modificar, tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP.

De acuerdo con esta invención, el método implica el empleo de cultivos primarios de neuronas corticales obtenidos a partir de un modelo animal para la enfermedad de Alzheimer, los ratones triple transgénicos 3xTgAD. Los cultivos celulares se obtienen a partir de fetos de ratones 3xTgAD y se comparan con cultivos no tratados o con cultivos obtenidos de ratones control non-3xTgAD proporcionando así un sistema *in vitro* para evaluar los efectos de diferentes compuestos en las propiedades bioquímicas y funcionales de neuronas control y neuronas con neuropatología característica de la EA y/o enfermedades relacionadas. Este método proporciona un modelo económico, fiable y rápido y permite el empleo de técnicas de análisis que no requieran esperar a alcanzar un determinado estado de desarrollo del animal tal como se emplea en modelos *in vivo* para la enfermedad de Alzheimer. La utilización de cultivos celulares primarios, preferentemente cultivos corticales, obtenidos a partir de animales triple transgénicos 3xTgAD es una nueva aproximación para identificar y descubrir terapias (farmacológicas o no) relacionados con la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los cultivos celulares primarios obtenidos a partir de ratones 3xTgAD presentan numerosas ventajas sobre otras preparaciones tales como cultivos neuronales primarios obtenidos de ratones transgénicos para la EA que sobreexpresan solamente beta-amiloide o tau, rodajas de cerebro o experimentos *in vivo* para evaluar la eficacia de compuestos en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer. Entre estas ventajas destacan: facilidad de acceso de sustancias aplicadas extracelularmente, capacidad para evaluar la eficacia de un compuesto después de un corto período de tiempo, fácil visualización de células y sinapsis para medidas ópticas y electrofisiológicas, capacidad para mantener acceso a las células en un entorno controlado para manipulaciones genéticas y bioquímicas, y la simplicidad de los protocolos de ensayo, diagnóstico o evaluación debido a la exclusión de diferentes tipos de células no neuronales, así como la sobreexpresión simultánea de APP, β A y Tau.

La invención propuesta describe varias utilidades basadas en el descubrimiento de que este modelo presenta sobreexpresión de β -amiloide, APP y Tau.

A lo largo de toda la descripción y reivindicaciones de la especificación, la palabra “comprende” y las variaciones de la misma, no pretenden excluir otros aspectos de la presente invención, que resultarán evidentes para un experto en la materia a la vista de la descripción.

La exposición detallada de los modos de realización (ejemplos) y de las figuras que siguen se proporciona a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Obtención de los cultivos neuronales primarios

De acuerdo con esta invención, los cultivos neuronales primarios obtenidos de fetos de 15-17 días de gestación de animales triple transgénicos 3xTgAD constituyen un modelo celular con sobreexpresión simultánea de APP, tau y Beta-amiloide lo que permite el estudio *in vitro* de las bases biológicas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo expresión génica y proteica, actividades enzimáticas, sistemas de neurotransmisión, propiedades funcionales de las neuronas afectadas por la EA y de los elementos involucrados en la cascada de beta-amiloide así como los procesos inflamatorios y excitotóxicos o de estrés oxidativo asociados a la patología de la EA.

En la presente invención los cultivos primarios se establecen a partir de embriones de 15-17 días de gestación obtenidos de ratones 3xTgAD y ratones control non-3xTgAD. El procedimiento empleado para obtener cultivos corticales primarios de acuerdo con la presente invención es el siguiente:

Los cultivos celulares, preferentemente corticales se obtienen a partir de la corteza cerebral de embriones de ratones 3xTgAD y non-3xTgAD de entre 15 y 17 días de gestación. Las hembras gestantes se sacrifican mediante anestesia con éter, se desinfecta el abdomen con etanol al 70% y se extraen los fetos. El útero, conteniendo los fetos se transfiere a una campana de flujo laminar en una placa de Petri y a continuación se extraen los fetos. La corteza cerebral se separa del resto del cerebro y las células se diseccionan empleando tratamiento enzimático y disgregación mecánica. La corteza cerebral fetal se extrae, se corta y se disocia mediante tratamiento con tripsina y posterior tratamiento con solución conteniendo inhibidor de tripsina y DNasa. Las células disociadas se centrifugan (5 minutos a 1000 rpm) y se resuspenden en medio de cultivo de Dulbecco que contiene 10% v/v de suero fetal bovino, 10-25 mM KCl, 0,2 mM glutamina, 10 unidades/l de penicillin G, 0,1 I.U./l de insulina y 7,3 μ M de ácido p-aminobenzoico. Las células se siembran en placas de cultivo pretratadas con poly-D-lysine (entre 10 y 60 mg/l) y se mantienen a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ /95% aire. Entre 36 y 48 horas en cultivo se añade arabinósido de citosina (20 μ M) para prevenir la proliferación de células no neuronales en el caso de que se deseen obtener cultivos de neuronas corticales puros. Este último paso puede obviarse cuando sea necesario obtener cultivos mixtos de neuronas y glia. A partir de los 6 días en cultivo se ha caracterizado la sobreexpresión de la APP, tau y beta-amiloide en los cultivos neuronales primarios obtenidos de ratones 3xTgAD en comparación con los cultivos neuronales primarios obtenidos de ratones silvestres sometidos al mismo procedimiento (non-3xTgAD).

Ejemplo 2

Evaluación de la eficacia de compuestos y materiales utilizando la composición de la presente invención

- 5 De acuerdo con esta invención cultivos neuronales primarios de animales triple transgénicos 3xTg-AD para la enfermedad de Alzheimer han sido caracterizados para evaluar la eficacia de compuestos y materiales (ejemplo, fármacos y otros agentes y sustancias biológicos o sintéticos) en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer o enfermedades asociadas a beta-amiloide y/o tau y APP. Los compuestos que pueden ser evaluados en este modelo incluyen pequeñas moléculas tales como péptidos y proteínas, agentes biológicos, compuestos químicos y fármacos.
- 10 Preferentemente, serán compuestos no tóxicos y bien tolerados para ser empleados en el tratamiento, terapia y prevención de la EA o enfermedades asociadas a beta-amiloide y/o tau. Las respuestas de las células en este modelo celular pueden ser determinadas de manera cuantitativa, permitiendo por lo tanto determinar la actividad o efecto de un compuesto en los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que tengan lugar en la célula y que estén asociados con EA o enfermedades relacionadas con beta-amiloide y/o tau. Para la determinación inmunocitoquímica de la sobreexpresión proteica presente en este modelo *in vitro*, los cultivos neuronales obtenidos de animales 3xTgAD y non-3xTgAD se fijan en paraformaldehído al 4% y posteriormente se marcan con anticuerpos primarios frente a APP/ β A (NAB228: 1:50), β -amiloide 6E10 (1:500), Tau 46 (Tau Total 1:500), Tau HT7 (1:200, residuos 159-163), Tau AT8 (Tau fosforilada en Ser 202, 1:100), Tau AT100 (1:100, tau fosforilada en Thr 212 y Ser 214) y Tau AT270 (1:100, Tau fosforilada en Thr 181). La inmunoreactividad se visualiza empleando un anticuerpo secundario fluorescente en microscopio confocal (Nikon, Mellville, NY, USA), con una cámara ORCA-ER Hamamatsu (Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu, Japón). Los controles para la especificidad de los métodos de detección se realizaron omitiendo la incubación con el anticuerpo primario en uno de cada cuatro pocillos consecutivos. Ninguno de los pocillos sin anticuerpo primario mostró ninguna señal comparable a la señal obtenida con los anticuerpos primarios.
- 25 Este proceso se puede automatizar para HTS (high throughput screening) utilizando placas de cultivo a las que previamente se añadieron las células, que fueron cultivadas durante al menos 6 días. Estas placas son susceptibles de ser incorporadas a sistemas automáticos de medición de los marcadores que interesen, mediante distintos métodos de medida (absorbancia, luminiscencia, fluorescencia). De la misma forma, el efecto de diferentes terapias en dianas celulares, moleculares y bioquímicas de relevancia para la enfermedad de Alzheimer es susceptible de ser investigado en este modelo *in vitro* mediante métodos de HTS empleando kits comerciales de interés para la evaluación del efecto de un tratamiento de cualquier naturaleza en la evolución de la EA o enfermedades asociadas a tau y beta-amiloide, después de que las células hayan sido sometidas al tratamiento en cuestión.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para evaluar la eficacia de compuestos y materiales para modificar, tratar o prevenir enfermedades relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP que comprende el empleo de cultivos primarios de neuronas corticales obtenibles a partir de embriones de ratones 3XTgAD cultivados en condiciones despolarizantes.

2. Método *in vitro* de acuerdo con la primera reivindicación, donde los compuestos evaluados se seleccionan del grupo que consiste en péptidos, polipéptidos, proteínas, agentes biológicos, sustancias químicas o fármacos.

3. Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

4. Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el proceso de evaluación se lleva a cabo empleando métodos de HTS (*high through-put screening*).

5. Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los cultivos primarios de neuronas se obtienen a partir de embriones de ratones 3XTgAD cuya edad está comprendida entre 15-17 días de gestación.

6. Composición que comprende cultivos primarios de neuronas corticales obtenibles a partir de embriones de ratones 3XTgAD cultivados en condiciones despolarizantes.

7. Método de preparación de la composición de la reivindicación 6, que comprende los siguientes pasos:

a. Extraer y disociar la corteza cerebral fetal de embriones de ratones 3XTgAD mediante tratamiento con tripsina,

b. Tratar la corteza cerebral fetal con solución conteniendo inhibidor de tripsina y DNAsa.

c. Centrifugar,

d. resuspender las células en medio de cultivo de Dulbecco que contiene suero fetal bovino, KCl, glutamina, antibiótico, insulina y ácido p-aminobenzoico.

e. Sembrar las células en placas de cultivo pretratadas con poli-D-lisina y mantenerlas a aproximadamente 37°C en una atmósfera húmeda.

8. Método de preparación de la composición de la reivindicación 6 según la reivindicación anterior, donde los embriones de ratones 3XTgAD tienen una edad de entre 15 y 17 días de gestación.

9. Método de preparación de la composición de la reivindicación 6 según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, que además comprende:

f. añadir arabinósido de citosina entre 36 y 48 horas de cultivo.

10. Uso de la composición de la reivindicación 6 para el estudio de las bases biológicas de enfermedades relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP.

11. Uso de la composición de la reivindicación 6 para evaluar la eficacia de compuestos y materiales para modificar, tratar o prevenir enfermedades relacionadas con patología tau, beta-amiloide o APP.

12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, donde la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

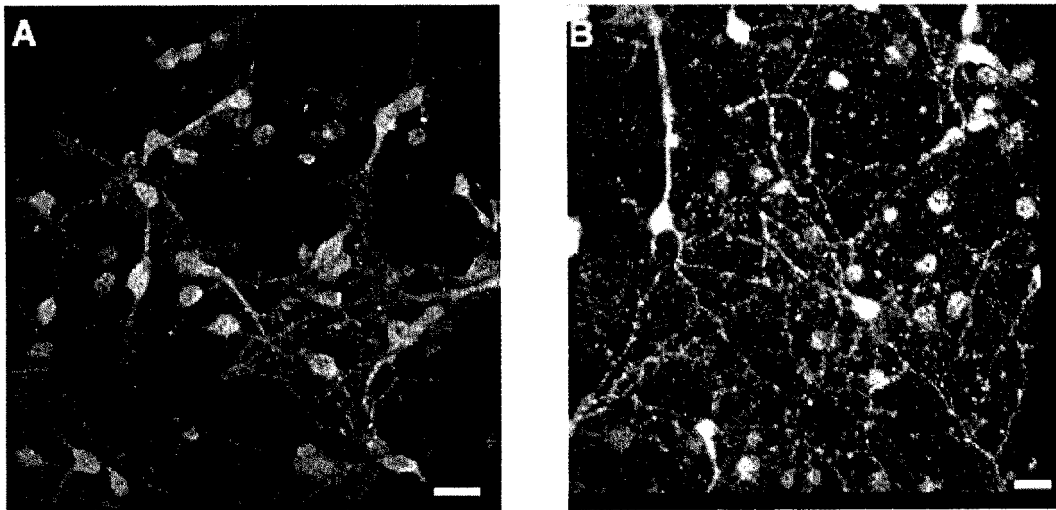


Fig. 1

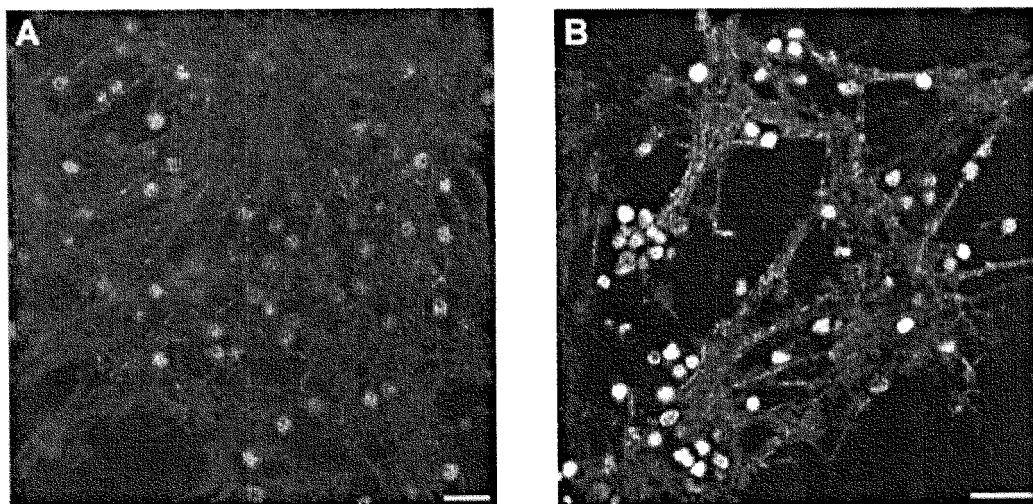


Fig. 2

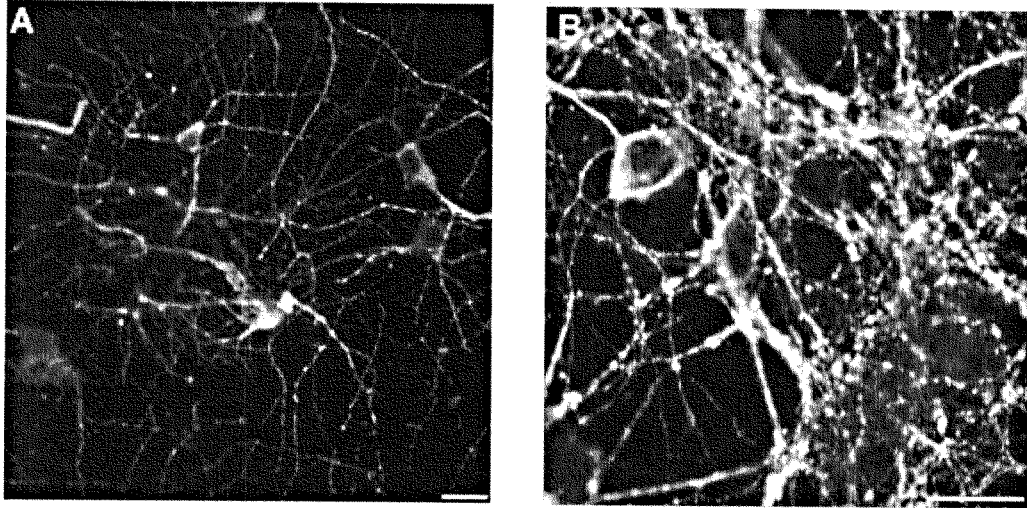


Fig. 3

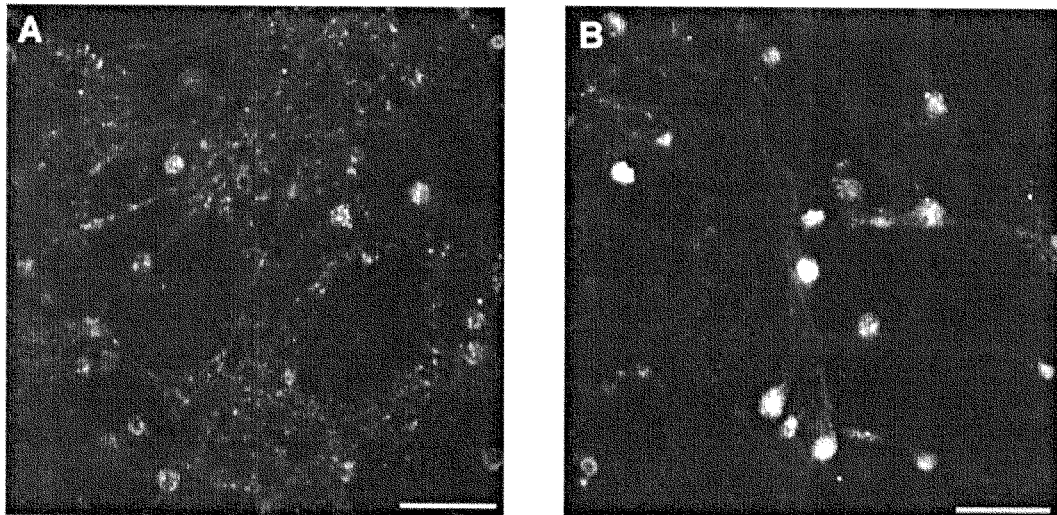


Fig. 4

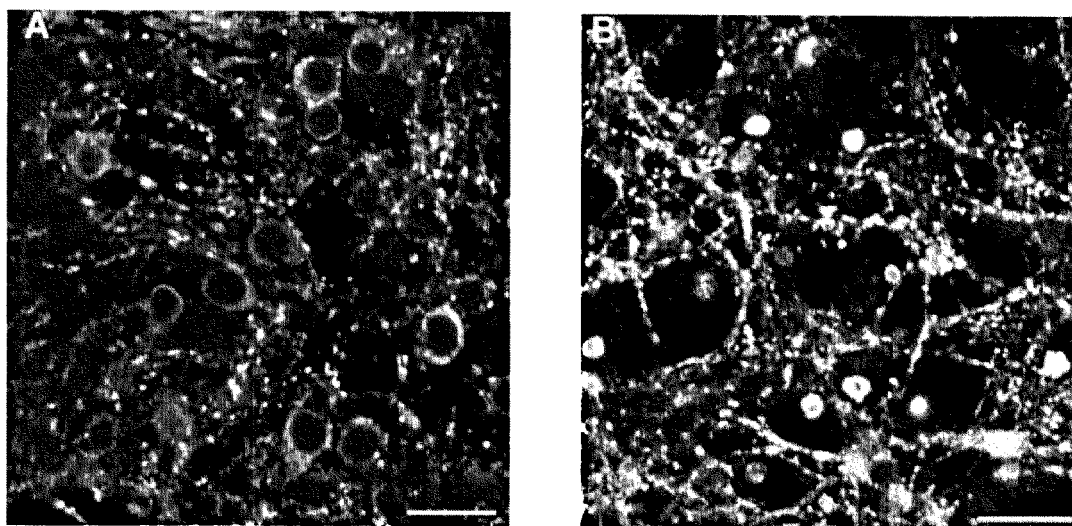


Fig. 5

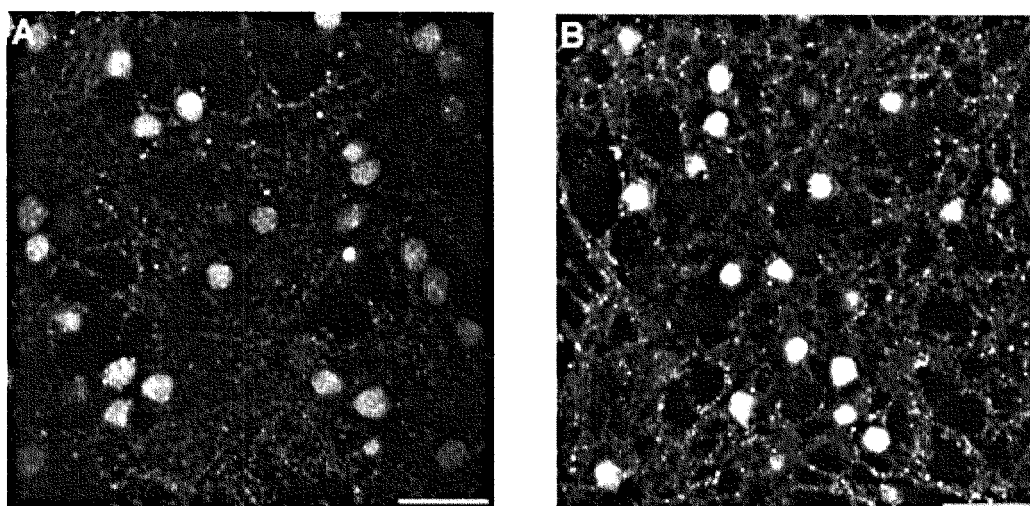


Fig. 6

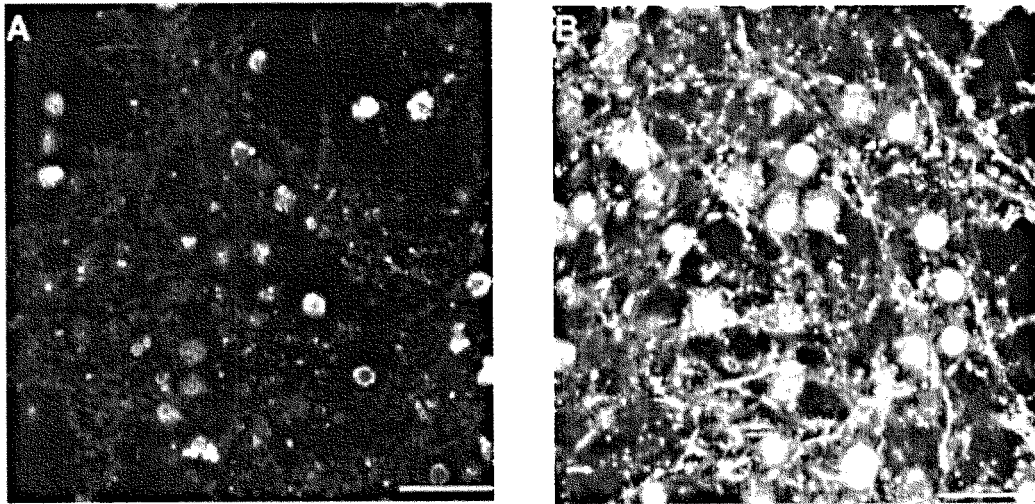


Fig. 7

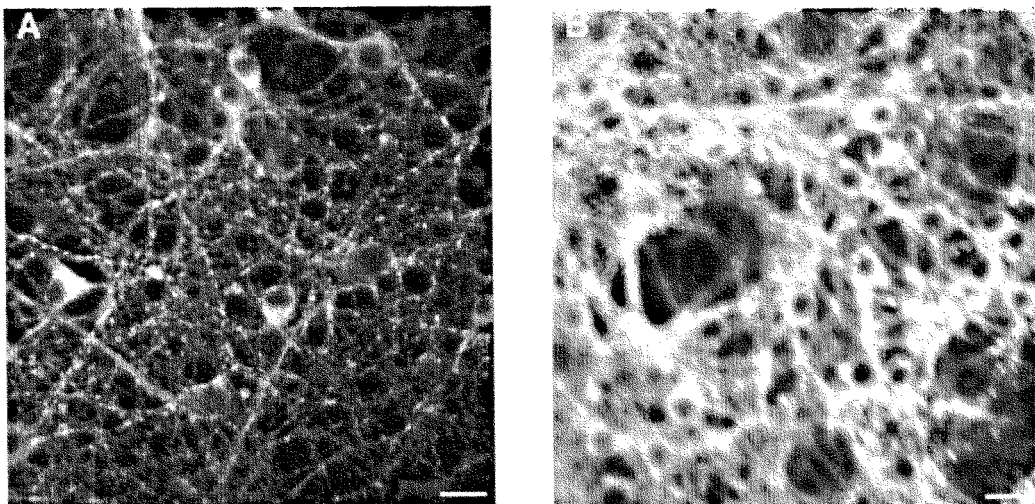


Fig. 8



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 335 848

⑫ Nº de solicitud: 200802799

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 02.10.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 03053136 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 03.07.2003, resumen; página 8, líneas 1-25; reivindicaciones 1-7, 15-21, 28, 34-39; figura 1.	1-12
Y	FAURÉ, J., et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. Molecular and cellular neurosciences. Abril 2006. Vol. 31(4), páginas 642-948. ISSN 1044-7431. Ver resumen; página 645; página 646, último párrafo; y página 647, 2º párrafo.	1-12
A	ROMANO, A., et al. Neuronal fibrillogenesis: amyloid fibrils from primary neuronal cultures impair long-term memory in the crab Chasmagnathus. Behavioural brain research. 17.12.2003. Vol. 147(1-2), páginas 73-82. ISSN 0166-4328. Ver resumen; página 74.	1-12
A	HASEGAWA, T., et al. Etiological compound of homocysteic acid for Alzheimer's disease and preventive and cure effect of pyroloquinoline quinone (PQQ). Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association. 01.07.2007. Vol. 3(3), página S122. ISSN 1552-5260. Ver todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

03.03.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/30 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WIPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-12	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 03053136 A2	03-07-2003
D02	FAURÉ, J., et al.	04-2006
D03	ROMANO, A., et al.	17-12-2003
D04	HASEGAWA, T., et al.	01-07-2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica el uso de cultivos neuronales de embriones de ratones triple transgénicos 3XTgAD cultivados en condiciones despolarizantes para evaluar in vitro la eficacia de posibles compuestos útiles en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue un método ni un cultivo celular como los de la solicitud, por lo que ésta se considera nueva según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En este documento de patente se describe la generación de un animal triple transgénico con las mismas mutaciones que las de las células de los cultivos reivindicados en la solicitud. De hecho, el ratón 3xTg-AD descrito en D01 y reivindicado en las reivindicaciones 1 a 7, 15 a 21, 28, 34 y 35, es el animal del cual se obtienen las células cultivadas en la solicitud. En este documento, los ratones transgénicos creados se utilizan en un método para analizar agentes activos biológicamente potencialmente útiles en el tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer (ver página 8, líneas 17 a 25, y reivindicaciones 36 a 39). Por tanto, para que el experto en la materia llegara a la información descrita en la solicitud a partir de lo divulgado en D01, es decir, para pasar del método in vivo al método in vitro, únicamente debería obtener cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de los ratones 3xTg-AD descritos en el documento D01.

La generación de cultivos celulares neuronales es una técnica ampliamente extendida en el estado de la técnica. Así, en el documento D02 se divulga la obtención de cultivos corticales neuronales (de embrión de rata y de ratón recién nacido, página 646, último párrafo). En este mismo documento se emplean condiciones despolarizantes en los cultivos (KCl 25 mM) para facilitar la liberación de proteínas cerebrales, y se añade a los cultivos arabinósido de citosina (ver páginas 645 y 647). Por tanto, en D02 el experto en la materia encontraría las mismas condiciones de cultivo empleadas en la solicitud.

En consecuencia, sería evidente para el experto en la materia la combinación de los documentos D01 y D02 para llegar al método reivindicado en la solicitud que, en consecuencia, no cumpliría el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

También en el documento D03 se describen cultivos de células neuronales obtenidas de cerebelo de rata, que se crecen en condiciones despolarizantes (25 mM KCl) y se emplean para estudiar la formación de agregados de proteína beta-amiloide, uno de los pasos cruciales en la patología de la enfermedad de Alzheimer. Aunque se utilizan condiciones de cultivo semejantes a las de la solicitud, no se considera que este documento afecte la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud, al emplearse células diferentes en los cultivos.

El documento D04 divulga el uso de cultivos primarios de células neuronales de embrión de rata para estudiar el efecto etiológico del ácido homocisteico en la enfermedad de Alzheimer. Aunque en este mismo documento se realizan estudios con el ratón 3xTg-AD, no se obtienen cultivos celulares del ratón, por lo que el documento D04 no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.