

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 789**

21 Número de solicitud: 201100471

51 Int. Cl.:

C12N 5/0793 (2010.01)

C07C 317/50 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

20.04.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.11.2012

Fecha de la concesión:

20.09.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.10.2013

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE OVIEDO (50.0%)
C/ San Francisco, 3
33003 OVIEDO (Asturias) ES y
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI (50.0%)

72 Inventor/es:

NOVELLI CIOTTI, Antonello;
FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, María Teresa;
VARGIU, Simona y
CABONI, Pierluigi

54 Título: **Método para la selección de células neuronales en función de su diferenciación mediante exposición a flubendiamida.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento para la selección de células neuronales en cultivo en función de su diferenciación, a través del establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de distintas concentraciones de flubendiamida a varios grupos de células neuronales. De aplicación en aquellos sectores que precisen de la detección, identificación y cuantificación de la población de células neuronales en diferenciación para fines investigadores y/o terapéuticos, como por ejemplo en la investigación sobre el efecto de factores o sustancias del ámbito medioambiental, agroalimentario, químico, farmacéutico, etc, y en terapias antitumorales o neuro-regenerativas.

ES 2 390 789 B1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA SELECCIÓN DE CÉLULAS NEURONALES EN FUNCIÓN DE SU DIFERENCIACIÓN MEDIANTE EXPOSICIÓN A FLUBENDIAMIDA

5 La presente invención se refiere a un método para la selección de células neuronales en función de su nivel de diferenciación.

 La invención resulta de aplicación en aquellos sectores que precisen de la detección, identificación y cuantificación de la población de células neuronales en diferenciación para fines investigadores y/o terapéuticos, como por ejemplo en la
10 investigación sobre el efecto de factores o sustancias del ámbito medioambiental, agroalimentario, químico, farmacéutico, etc., y en terapias antitumorales o neuro-regenerativas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Las células neuronales adultas representan el grado máximo de diferenciación celular. Durante el proceso de diferenciación, adquieren todas las propiedades que, oportunamente integradas, permiten el funcionamiento del sistema nervioso. El proceso de diferenciación neuronal es consecuentemente un momento crítico para el correcto funcionamiento del sistema nervioso y, particularmente en el ser humano,
20 para el desarrollo de sus facultades mentales. Fallos en la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario humano conllevan importantes déficits cognitivos en la vida posnatal cuando ésta es posible, y fallos en la diferenciación neuronal de células madres del sistema nervioso central adulto pueden dar lugar a la formación de tumores particularmente agresivos e incapacitantes.

25 Existen múltiples técnicas para la selección de células en función de su grado de diferenciación. Cada técnica aprovecha metodologías diferentes (físicas, biofísicas, químicas, farmacológicas, inmunológicas, etc.) asociadas con peculiares características génicas, bioquímicas, fisiológicas, que pueden satisfacer muchas necesidades experimentales. Sin embargo es laborioso y complejo aislar poblaciones
30 de células neuronales durante su desarrollo in vitro ya que se necesitan aparatos

específicos, tales como un “cell-sorter”, que no están siempre al alcance de todos los laboratorios, y esto obliga a los investigadores de varios grupos a compartir los aparatos disponibles aumentando los problemas técnicos inherentes (limpieza, esterilidad, calibración, etc) y el tiempo necesario para conseguir la población neuronal deseada.

- 5 Además, esto se obtiene sólo en células neuronales que todavía no se hayan adherido a una superficie de cultivo y no hayan iniciado su desarrollo morfológico, bioquímico y fisiológico, de tal manera que no es posible aprovechar estos factores en la selección de las células neuronales .

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A los efectos de la presente invención y su descripción, la flubendiamida es 3-iodo-N'-(2-metil-1,1-dimetiletil)-N-{4-[1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluorometil)etil]-o-tolil}ftalimida.

- El método objeto de la presente invención se basa en que la exposición a la flubendiamida de una población de células nerviosas con distinto grado de diferenciación, induce la muerte de las células neuronales menos diferenciadas. Con este método es posible: 1) determinar el número de células nerviosas que consiguen una diferenciación más rápida en respuesta a distintos tratamientos físicos, químicos y farmacológicos; 2) obtener cultivos neuronales más homogéneos en sus propiedades fisiológicas; 3) reducir la variabilidad de la respuesta celular a la exposición a sustancias de interés fármaco-toxicológico; 4) seleccionar poblaciones neuronales resistentes a la flubendiamida para el estudio de los mecanismos de resistencia con el fin de aprovecharlos terapéuticamente.

- La presente invención se refiere a un método para seleccionar células neuronales en función de su grado de diferenciación que comprende los siguientes parámetros y etapas:

- Parámetros:

- 1) número de días del cultivo primario.
- 2) tiempo de exposición a flubendiamida.
- 30 3) concentraciones de flubendiamida.

- Etapas:

- 5 a) Establecimiento de 5 grupos (A, B, C, D, E) de células neuronales, en su primer, 2º, 4º, 6º y 8º día en cultivo respectivamente, donde cada grupo debe constar de no menos de 2 placas del mismo cultivo (A', A''; B', B''; C', C''; D', D''; E', E'').
- 10 b) Establecimiento de una cinética toxicológica por exposición de grupos de células de la misma edad en cultivo a la misma concentración micromolar de flubendiamida que debe variar entre 0, 1, 2, 5, 10 y 20 µM, durante 12h, 24h, 48h, 72h y 96h desde el momento de la adición de flubendiamida, de tal forma que, siguiendo el esquema indicado en la Tabla I como ejemplo para el grupo A, se obtienen los grupos: A,[0],12, A,[0],24, A,[0],48, A,[0],72, A,[0],96; A,[1],12, A,[1],24, A,[1],48, A,[1],72, A,[1],96... etc. hasta E,[20],96, donde el número entre corchetes indica la concentración de flubendiamida.
- 15 c) Detección de los efectos citotóxicos inducidos por la flubendiamida en cada grupo de células y cuantificación de los niveles de viabilidad celular mediante el uso de protocolos o métodos efectivos para estos propósitos.
- 20 d) Identificación de la concentración de flubendiamida que produce el máximo efecto tóxico en relación a la edad de las células y al tiempo de exposición en cultivo, para su posterior utilización en la selección de poblaciones de células neuronales en cultivos destinados a la investigación.
- 25 e) Interrupción del tratamiento con flubendiamida en cultivos destinados a la investigación mediante lavado de las células previamente tratadas utilizando una solución fisiológica.

Tabla I: Ejemplo, para el grupo A, de organización de grupos en función del tiempo de exposición a la flubendiamida y la concentración de la misma.

Grupo A	Tiempo de exposición a la flubendiamida (h)				
Concentración de flubendiamida (μM)	12	24	48	72	96
0	A[0]12	A[0]24	A[0]48	A[0]72	A[0]96
1	A[1]12	A[1]24	A[1]48	A[1]72	A[1]96
2	A[2]12	A[2]24	A[2]48	A[2]72	A[2]96
5	A[5]12	A[5]24	A[5]48	A[5]72	A[5]96
10	A[10]12	A[10]24	A[10]48	A[10]72	A[10]96
20	A[20]12	A[20]24	A[20]48	A[20]72	A[20]96

En una realización preferida, las células neuronales son neuronas del sistema nervioso central en cultivo primario. En una realización más preferida, las neuronas del sistema nervioso central en cultivo primario son neuronas granulares de cerebelo de rata.

En una realización específica, la detección de los efectos citotóxicos y cuantificación de la viabilidad celular se realizan mediante la observación de los cultivos celulares con microscopía en contraste de fase. En una realización más específica. En una realización más específica, la detección de los efectos citotóxicos y cuantificación de la viabilidad celular se realizan utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia. En una realización aún más específica, la detección de los efectos citotóxicos y la cuantificación de los niveles de viabilidad celular se realizan transcurridas 12h, 24h, 48h, 72h y 96h desde la adición de flubendiamida.

En otra realización específica, la progresión de los efectos del tratamiento con flubendiamida se interrumpe mediante lavado de las células con medio de cultivo. En una realización más específica, el lavado de las células se realiza utilizando medio de cultivo procedente de células no tratadas de la misma edad.

La aplicación del presente método para la selección de neuronas en función de su diferenciación requiere una inversión mínima ya que la mayor parte de los

laboratorios en la actualidad dispone de instalaciones para cultivos celulares dotadas de:

- Una campana de flujo laminar.
- Un incubador de CO₂.
- 5 - Un microscopio de contraste de fases con epifluorescencia.

El procedimiento de la presente invención se sitúa entre las técnicas que se aprovechan del uso de compuestos químicos. Utiliza el compuesto flubendiamida que nunca ha sido utilizado para el fin que aquí se propone, y permite seleccionar poblaciones de células neuronales que hayan ya iniciado su desarrollo morfológico,
 10 bioquímico y fisiológico en un “network” in vitro, tras adherirse a la superficie de la placa de cultivo; de suerte que el proceso de selección no altera el patrón de crecimiento y diferenciación general de las neuronas en cultivo.

Las ventajas de este método se encuentran en: 1) la obtención de una población neuronal seleccionada organizada en cultivo en un “network”; 2) la especificidad
 15 celular de los efectos, que se detectan en células neuronales; 3) la especificidad cronológica de sus efectos, que se manifiestan particularmente durante el desarrollo neuronal; 4) la progresividad de sus efectos que pueden ser controlados suspendiendo el tratamiento, lo cual permite realizar la selección de una población de células que en su mayoría serán viables.

20 La invención resulta de aplicación en aquellos sectores vinculados a:

- 1) Tecnología bio-sanitaria que precise de la utilización de una población celular en la que se haya eliminado la presencia de células neuronales con un grado de diferenciación inferior.
- 2) Tecnología bio-sanitaria que precise de la utilización de una población celular
 25 en la que se haya eliminado la presencia de células neuronales en las que se asocie la toxicidad de flubendiamida con un grado de diferenciación inferior.
- 3) Control de calidad de la producción industrial de moléculas cuyos efectos farmaco-toxicológicos puedan determinarse en poblaciones celulares seleccionadas por grado de diferenciación.
- 30 4) Control de la presencia de contaminantes en alimentos y otros productos

relacionados con la salud humana y animal en cuya determinación se utilicen poblaciones celulares seleccionadas por su grado de diferenciación.

EXPLICACIÓN DE UNA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERENTE

5 Para una mejor comprensión de la presente invención, se expone el siguiente ejemplo de realización preferente, descrito en detalle, que debe entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

La preparación de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario se llevó a cabo mediante el procedimiento previamente establecido
10 que se describe a continuación:

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución I

NaCl 124 mM, KCl 5,37 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, D-glucosa 14,5 mM, Hepes 25 mM, rojo fenol 27 µM, MgSO₄ 1,2 mM, seroalbúmina bovina (BSA) 3 mg/mL. La solución
15 se equilibró a pH 7,4 con NaOH.

Solución II

Solución I suplementada con 0,25 mg/mL de tripsina.

Solución III

Solución I suplementada con 80 µg/mL de Desoxirribonucleasa I (DNAsa I), 0,52
20 mg/mL de inhibidor de tripsina y MgSO₄ elevado a 2,8 mM.

Solución IV

Solución I suplementada con 25,6 µg/mL de DNAsa I, 166,4 µg/mL de inhibidor de tripsina y MgSO₄ elevado a 1,7 mM.

Solución V

25 Solución I suplementada con 0,1 mM de CaCl₂ y elevada a 2,5 mM de MgSO₄.

A continuación se extrajeron por disección 8-13 cerebelos procedentes de crías de rata de 8 días de edad y se depositaron en 2 mL de solución I. Con ayuda de unas pinzas, se eliminó la meninge que individualiza el cerebelo de otras partes del cerebro

y lo separa del hueso del cráneo. Los cerebelos se desmenuzaron mediante cortes ortogonales con una cuchilla, y los pequeños fragmentos de tejido se resuspendieron en 30 mL de solución I. Tras una centrifugación a baja velocidad, el tejido se resuspendió en 30 mL de solución II y se incubó a 37 °C durante 10 min con agitación
 5 con el fin de producir la tripsinización del mismo. La reacción se detuvo añadiendo 15 mL de la solución IV. La suspensión se agitó ligeramente durante 1 minuto y después se centrifugó. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de solución III.

El tejido se sometió entonces a una disgregación mecánica, disociando por aspiración-expulsión con una pipeta Pasteur, y se añadieron 5 mL de solución V. La
 10 suspensión se agitó y se dejó reposar verticalmente durante 5-10 min con el fin de permitir la sedimentación de posibles grumos de células no disociadas. Las células en suspensión se recogieron por centrifugación a baja velocidad durante 5 min y el precipitado obtenido se resuspendió en medio de cultivo Basal Eagle's Medium suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (inactivado por calor a 56 °C durante
 15 30 min), 100 µg/mL de gentamicina, 2 mM de glutamina y 25 mM de KCl.

Los grumos de células no disociadas se sometieron a un nuevo tratamiento de trituración con una pipeta Pasteur, y las células disociadas así obtenidas se añadieron a las anteriores. Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/cm² sobre placas Petri de plástico pretratadas con poli-L-lisina (5 µg/mL). Los cultivos se
 20 incubaron a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ al 5 % y una humedad del 95 %. Tras este proceso se obtuvieron 10-12 placas de cultivo de 35 mm de diámetro por cerebelo, y la preparación se llevó a cabo en aproximadamente 3 h. La utilización de placas de menor diámetro permitió aumentar considerablemente el rendimiento sin perjudicar la sensibilidad del método.

25 Con objeto de impedir la replicación de las células no neuronales se añadió, al cabo de 20-24 h, un agente citostático (arabinofuranósido de citosina, 10 µM). Las células pudieron mantenerse varias semanas en cultivo añadiendo periódicamente glucosa (5,6 mM) al medio de cultivo y reponiendo la pérdida de agua debida a la evaporación. Después de ocho días en cultivo, más del 95 % de la población neuronal
 30 pudo ser identificada morfológicamente como perteneciente al tipo de neurona granular, siendo el 5 % restante neuronas GABAérgicas fundamentalmente. La proporción de astrocitos no superó el 3 %.

Se establece una cinética toxicológica por exposición de grupos de células de la misma edad en cultivo a la misma concentración micromolar de flubendiamida que debe variar entre 0, 1, 2, 5, 10 y 20 μM , durante 12h, 24h, 48h, 72h y 96h desde el momento de la adición de flubendiamida, de tal forma que indicando con las letras A, B, C, D, E los grupos de células de distinta edad en cultivo y siguiendo el esquema indicado en la Tabla I, se obtienen los grupos: A,[0],12, A,[0],24, A,[0],48, A,[0],72, A,[0],96; A,[1],12, A,[1],24, A,[1],48, A,[1],72, A,[1],96... etc. hasta E,[20],96, donde el número entre corchetes indica la concentración de flubendiamida. Los tratamientos fueron añadidos al medio de cultivo y las neuronas fueron mantenidas en el incubador en las condiciones ya descritas.

La cuantificación de la supervivencia neuronal se llevó a cabo usando el siguiente protocolo:

- Se aspiró el medio de cultivo.
- Se adicionó 1 mL de la solución de Locke modificada (NaCl 130 mM, CaCl_2 2.3 mM, KCl 5.6 mM, MgCl_2 1 mM, Hepes 8.4 mM, glucosa 5.6 mM, pH 7.4.
- Se aspiró y adicionó nuevamente 1 mL de la misma solución.
- Se aspiró y adicionó nuevamente 1 mL de solución Locke modificada que contiene 150 $\mu\text{g/mL}$ de diacetato de fluoresceína.
- Se incubó 4 min a 37°C .
- Se visualizó en un microscopio de epifluorescencia.

Mediante esta técnica, las células vivas aparecieron perfectamente teñidas con el colorante fluorescente, y morfológicamente identificables, mientras que los núcleos de las células muertas se visualizaron como puntos rojos. Se fotografiaron al azar varios campos representativos del cultivo y se procedió al recuento tanto de las células vivas (de color verde), como de las muertas (de color rojo), calculando finalmente el porcentaje de supervivencia neuronal al dividir el número de neuronas vivas entre el número total de neuronas (vivas y muertas) en cada fotografía. Se evidenció la disminución de la mortalidad neuronal tras tratamiento con flubendiamida al aumentar la edad en cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la selección de células neuronales en cultivo en función de su diferenciación, que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a) establecimiento de 5 grupos (A, B, C, D, E) de células neuronales, en su 1^{er}, 2^o, 4^o, 6^o, 8^o día en cultivo respectivamente, donde cada grupo debe constar de no menos de 2 placas del mismo cultivo (A', A''; B', B''; C', C''; D', D''; E', E'');
 - 10 b) establecimiento de una cinética toxicológica por exposición de grupos de células de la misma edad en cultivo a la misma concentración micromolar de flubendiamida que debe variar entre 0, 1, 2, 5, 10 y 20 μ M, durante 12h, 24h, 48h, 72h y 96h desde el momento de la adición de flubendiamida, de tal forma que se obtienen los grupos: A,[0],12, A,[0],24, A,[0],48, A,[0],72, A,[0],96; A,[1],12, A,[1],24, A,[1],48, A,[1],72, A,[1],96... etc. hasta E,[20],96, donde
 - 15 el número entre corchetes indica la concentración de flubendiamida.
 - c) detección de los efectos citotóxicos inducidos por flubendiamida en cada grupo de células y cuantificación de los niveles de viabilidad celular mediante el uso de protocolos o métodos efectivos para estos propósitos;
 - d) identificación de la concentración de flubendiamida que produce el máximo
 - 20 efecto tóxico en relación a la edad de las células en cultivo y al tiempo de exposición para su posterior utilización en la selección de poblaciones de células neuronales en cultivos destinados a la investigación;
 - e) interrupción del tratamiento con flubendiamida en cultivos destinados a la investigación mediante lavado de las células previamente tratadas utilizando
 - 25 una solución fisiológica.
 2. Procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado por que las células neuronales son neuronas del sistema nervioso central en cultivo primario.
 3. Procedimiento, según reivindicación 2, caracterizado por que las neuronas del
 - 30 sistema nervioso central en cultivo primario son neuronas granulares de cerebelo de rata.

4. Procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado por que la detección de los efectos citotóxicos y cuantificación de la viabilidad celular se realizan mediante la observación de los cultivos celulares con microscopía en contraste de fase.
- 5 5. Procedimiento, según reivindicación 4, caracterizado por que la detección de los efectos citotóxicos y cuantificación de la viabilidad celular se realizan utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia.
6. Procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado por que el lavado de las células se realiza utilizando medio de cultivo procedente de células no tratadas
10 de la misma edad.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100471

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.04.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N5/0793** (2010.01)
C07C317/50 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EBBINGHAUS-KINTSCHER, U., LÜMMEN, P., RAMING, K. et al. Flubendiamide, the first insecticide with a novel mode of action on insect ryanodine receptors. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 2007, Vol. 60, Nº 2, páginas 117-140.	1-6
A	KATO, K., KIYONAKA, S., SAWAGUCHI, Y. et al. Molecular characterization of flubendiamide sensitivity in the lepidopterous ryanodine receptor Ca^{2+} release channel. Biochemistry. Noviembre 2009, Vol. 48, Nº 43, páginas 10342-10352. ISSN 0006-2960 <Doi:10.1021/bi900866s>.	1-6
A	LAHM, G. P., CORDOVA, D., BARRY, J. D. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. Bioorganic & Medicinal Chemistry. Junio 2009, Vol. 17, Nº 12, páginas 4127-4133. ISSN 0968-0896. <Doi:10.1016/j.bmc.2009.01.018>.	1-6
A	EBBINGHAUS-KINTSCHER, U., LUEMMEN, P., LOBITZ, N. et al. Phthalic acid diamides activate ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels in insects. Cell Calcium. Enero 2006, Vol. 39, Nº 1, páginas 21-33. ISSN 0143-4160.	1-6
A	MASAKI, T. Study on the mechanism of insecticidal activity through disruption of intracellular calcium homeostasis. Journal of Pesticide Science. 2008, Vol. 33, Nº 3, páginas 271-272.	1-6

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
13.12.2011

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

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

C12N, C07C

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, COMPDX, INSPEC, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-6	SI
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-6	SI
	Reivindicaciones		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 se publica.

Consideraciones:

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	EBBINGHAUS-KINTSCHER, U. et al. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 2007, Vol. 60, Nº 2, páginas 117-140.	2007
D02	KATO, K. et al. Biochemistry. Noviembre 2009, Vol. 48, Nº 43, páginas 10342-10352.	03.11.2009
D03	LAHM, G. P. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry. Junio 2009, Vol. 17, Nº 12, páginas 4127-4133.	15.06.2009
D04	EBBINGHAUS-KINTSCHER, U. et al. Cell Calcium. Enero 2006, Vol. 39, Nº 1, páginas 21-33.	01.2006
D05	MASAKI, T. Journal of Pesticide Science. 2008, Vol. 33, Nº 3, páginas 271-272.	2008

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

El objeto de la presente solicitud, es un procedimiento para la selección de células neuronales en cultivo en función de su diferenciación, que comprende: a) establecimiento de cinco grupos de células neuronales que se encuentran en su 1^{er}, 2^o, 4^o, 6^o y 8^o día de cultivo; b) establecimiento de una cinética toxicológica por exposición de distintos cultivos de cada uno de los grupos anteriores, a una concentración de flubendiamida de 0, 1, 2, 5, 10 y 20 μ M durante 12, 24, 48, 72 ó 96 horas para cada una de las concentraciones indicadas; c) detección de los efectos citotóxicos inducidos por la flubendiamida en cada grupo de células y cuantificación de los niveles de viabilidad celular mediante la utilización de colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia; d) identificación de la concentración de flubendiamida que produce el máximo efecto tóxico en relación a la edad de las células en cultivo, y al tiempo de exposición; e) interrupción del tratamiento con flubendiamida, mediante el lavado de las células con medios de cultivo procedentes de células no tratadas de la misma edad (reivindicaciones 1 y de la 4 a la 6). Estas células pueden ser neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario (reivindicaciones 2 y 3).

En D01 se anticipa que la flubendiamida actúa sobre los receptores de rianodina (RyR) presentes en músculo y neuronas de distintos lepidópteros, provocando su apertura, lo que produce el incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico. El efecto insecticida primario parece ser la disrupción de la función muscular, aunque no se puede descartar que la acción de la flubendiamida sobre los RyR neuronales pueda contribuir a su toxicidad. En los estudios realizados sobre la actividad de la flubendiamida sobre los tres receptores de rianodina presentes en mamíferos (RyR1, RyR2 o RyR3), no se encontró ningún efecto del compuesto ni en líneas celulares que expresaban alguna de las tres isoformas, ni sobre el RyR3 de ratón expresado de manera recombinante en células CHO.

D02 investiga el mecanismo de acción de la flubendiamida. Este compuesto es específico del RyR de insectos, no afectando a la actividad de RyR1, RyR2 o RyR3 de mamíferos.

En D03 se divulga una revisión de diferentes moduladores del receptor de la rianodina (RyR). En él se afirma que la flubendiamida es un insecticida que afecta a los lepidópteros impidiendo su función muscular, mediante la alteración de la actividad del RyR. La flubendiamida es específica del RyR de insectos, no pareciendo actuar sobre ninguna de las isoformas del receptor presentes en mamíferos.

D04 estudia el efecto de la flubendiamida y compuestos relacionados, en neuronas de *Heliothis virescens*, así como en células CHO que expresan el RyR de *Drosophila melanogaster*, demostrando que se produce el incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólica. Sin embargo, la flubendiamida no afecta a las células de ratón C2C12, cuyo principal receptor es el RyR1.

En D05 se afirma que la actividad insecticida de la flubendiamida es debida a la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , a través de su interacción con el receptor RyR. Este compuesto no muestra toxicidad en ratas.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 Y 8.1 L.P. 11/1986)

La reivindicación 1 tiene por objeto, un procedimiento para la selección de células neuronales en cultivo en función de su diferenciación, que comprende: a) establecimiento de cinco grupos de células neuronales que se encuentran en su 1^{er}, 2º, 4º, 6º y 8º día de cultivo; b) establecimiento de una cinética toxicológica por exposición de distintos cultivos de cada uno de los grupos anteriores, a una concentración de flubendiamida de 0, 1, 2, 5, 10 y 20 µM durante 12, 24, 48, 72 ó 96 horas para cada una de las concentraciones indicadas; c) detección de los efectos citotóxicos inducidos por la flubendiamida en cada grupo de células y cuantificación de los niveles de viabilidad celular; d) identificación de la concentración de flubendiamida que produce el máximo efecto tóxico en relación a la edad de las células en cultivo, y al tiempo de exposición; e) interrupción del tratamiento con flubendiamida mediante el lavado de las células.

Los documentos D01, D02, D03, D04 y D05, divulgan la actividad de la flubendiamida como insecticida, al provocar la apertura de los canales de Ca^{2+} de los receptores de rianodina. Además, en todos se afirma que este compuesto es muy específico y que no afecta ni a células ni a los RyR1, 2, ó 3 de mamífero.

En consecuencia, ninguno de estos documentos, tomados solos o en combinación, llevan al experto en la materia a la utilización de la flubendiamida en el cultivo selectivo de células neuronales.

Por lo tanto, la reivindicación 1 cumple los requisitos de novedad (art. 6.1 L.P. 11/1986) y actividad inventiva (art. 8.1 L.P. 11/1986).

Las reivindicaciones de la 2 a la 8 son dependientes de la 1, y como ésta, también presentan novedad (art. 6.1 L.P. 11/1986) y actividad inventiva (art. 8.1 L.P. 11/1986).