



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 363 398**

② Número de solicitud: 201030065

⑤ Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 15/12 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **20.01.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
02.08.2011

⑦ Solicitante/s:
**Universidad Miguel Hernández de Elche
Avda. de la Universidad, s/n
03202 Elche, Alicante, ES**

⑦ Inventor/es: **Vilanova Gisbert, Eugenio y
Sogorb Sánchez, Miguel Ángel**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Métodos y composiciones para la identificación de compuestos embriotóxicos.**

⑤ Resumen:

Métodos y composiciones para la identificación de compuestos embriotóxicos.

La invención se relaciona con métodos para la identificación de compuestos capaces de alterar el desarrollo embrionario, es decir, compuestos con actividad embriotóxica o teratogénica. En concreto, la invención se basa en la capacidad de dichos compuestos de alterar la actividad NTE en células madre, de forma que es posible el uso de dichas células para detectar compuestos químicos con capacidad teratogénica o de alteración de la reproducción. Las alteraciones pueden ser a nivel de expresión génica o proteica, o a nivel enzimático. La invención se relaciona también con células madre modificadas en que expresan un gen reportero bajo el control del promotor del gen NTE así como a los usos de dichas células para la identificación de compuestos con actividad embriotóxica.

ES 2 363 398 A1

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la identificación de compuestos embriotóxicos.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se relaciona con el campo de la toxicología y, más concretamente, con el desarrollo de métodos para la determinación de la embriotoxicidad de un compuesto basados en la identificación de un gen cuya expresión se ve alterada en presencia de un compuesto embriotóxico.

10

Antecedentes de la invención

Una de las principales causas del descarte de compuestos terapéuticos candidatos es su toxicidad reproductiva o embriotoxicidad. Sustancias con actividad mutagénica, embriotóxica o teratogénica pueden ejercer un efecto citotóxico directamente y/o provocar alteraciones del desarrollo embrionario como resultado de mutaciones en el DNA. Además, los defectos de desarrollo pueden ser generados por la interferencia de las sustancias mutágenas o embriotóxicas en los procesos de regulación de la proliferación y diferenciación como consecuencia de alteraciones en el nivel de expresión de genes y proteínas.

20

La mayoría de los conocimientos actuales sobre la toxicidad de productos químicos proviene de datos obtenidos mediante ensayos con animales. Aunque los estudios en modelos animales son útiles para determinar posibles efectos en la reproducción de los fármacos y productos químicos, los resultados de los estudios en animales no garantizan que estos agentes tengan los mismos efectos reproductivos en seres humanos, probablemente debido al menos en parte a la diferencia en la composición genética de los animales y los seres humanos.

25

Hasta la fecha, todos los compuestos que llegan a fase clínica deben ser analizados en modelos animales para evaluar los posibles efectos de dichos compuestos en la reproducción. Estas pruebas *in vivo* requiere mucho tiempo, son caros, y tienen que llevarse a cabo en un elevado número de animales de laboratorio. Por lo tanto, hay una necesidad de métodos alternativos para probar la toxicidad potencial en la reproducción de las sustancias químicas que no requieran el uso de animales. Asimismo, existe una presión creciente en muchos países por reducir en la mayor medida posible el uso de animales de laboratorio.

30

En las últimas dos décadas, se han establecido sistemas de cultivos celulares como modelos de selección celular en toxicología. Sin embargo, en muchos casos, estos modelos *in vitro* usando cultivos primarios o líneas celulares establecidas no representaban las propiedades funcionales de las células somáticas especializadas puesto que el cultivo *in vitro* resulta a menudo en una pérdida de la capacidad de proliferación, de la viabilidad y de las propiedades específicas del tejido durante el cultivo a largo plazo.

35

También se han desarrollado métodos *in vitro* para determinar toxicidad y teratogenicidad de compuestos mediante el uso de embriones de mamíferos y de órganos de embriones. Estos procedimientos tienen la gran desventaja de que requieren el uso de un gran número de mamíferos vivos, en especial ratas y ratones. El uso de estos sistemas para la evaluación de embriotoxicidad es raro, porque el valor predictivo de la utilización de estos sistemas es de aproximadamente 70%. Además, estos estudios son lentos, laboriosos, costosos, requieren un alto nivel de habilidad técnica, y requieren su aprobación previa por distintas instituciones en cada país.

40

45

Recientemente se han desarrollado métodos para la detección de la embriotoxicidad de un compuesto basados en células pluripotentes derivadas de blastocistos. Este tipo de métodos monitoriza el efecto del compuesto ensayado en el proceso de diferenciación celular y, en concreto, en el cambio en el contenido de proteínas (Hulme *et al.*, 1990, *supra*), en el tamaño de la colonia (Newall y Beedles 1994, 1996, *supra*), en actividad enzimática (Laschinski, *et al.*, 1991, *supra*, Newall y Beedles, 1994, 1996, *supra*, Spielmann, *et al.*, 1997, *supra*), y en la expresión de receptores de superficie (Hooghe y Ooms, *Toxicol. In Vitro* 9:349-354, 1995).

50

El ensayo con células madre embrionarias ("EST") (Spielmann, H., *et al.*, 1997, *In Vitro. Toxicol.* 10, 119-127) es actualmente el ensayo más prometedor para predecir el potencial embriotóxico de compuestos. El método EST utiliza dos líneas celulares establecidas, los fibroblastos de ratón 3T3 como modelo de línea celular adulta, y las células madre embrionarias de ratón D3 y se basa en determinar la concentración de compuesto capaz de inducir un descenso del 50% en la viabilidad de ambas líneas celulares tras exposición crónica durante 10 días. Además, también se determina la concentración del compuesto capaz de inhibir en un 50% de diferenciación espontánea de las células D3 a cardiomiocitos. Utilizando estos tres parámetros se aplica una función estadística capaz de discriminar entre 3 diferentes niveles de embriotoxicidad: no embriotoxicidad, embriotoxicidad débil o embriotoxicidad fuerte (Spielmann *et al.*, 1997).

55

60

El método EST ha pasado ya los correspondientes estudios de prevalidación (Scholz *et al.*, 1999) y validación (Spielmann *et al.*, 2006), mostrando una capacidad de predicción de embriotóxicos fuertes del 100% y del 70% para embriotóxicos débiles o no embriotóxicos. Estos estudios han llevado al ECVAM a considerar que el método necesita mejoras antes de ser usado incorporado a la legislación con finalidades reguladoras.

65

ES 2 363 398 A1

La principal limitación del método EST radica en el protocolo de cuantificación del grado de diferenciación de la célula tratada a cardiomiocitos. Este protocolo se basa en la determinación mediante microscopía óptica de si el cuerpo embrionario generado tras 10 días de exposición es o no contráctil, de modo que a cada cuerpo embrionario se clasifica en diferenciado o no diferenciado como un todo, sin tener en cuenta que la diferenciación del cuerpo
5 embrionario puede ser parcial y no total, y que entre los distintos cuerpos embrionarios podría haber diferencias en el área con capacidad de contracción. Además de lo anterior, una fuente de variabilidad adicional en la determinación de la diferenciación es que ésta se establece por simple observación microscópica del cuerpo embrionario, por lo que la destreza y criterio del operador también pasa a ser un factor determinante.

10 Diversos estudios han propuesto mejoras al método EST. Así por ejemplo, se ha propuesto el uso de combinaciones de datos *in vitro* y estudios farmacocinéticos (Verwei *et al.*, 2006), la optimización de los protocolos de cultivo de las células D3 (De Smedt *et al.*, 2008); el uso de sistemas automatizados de análisis de imagen (Paparella *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2008); la cuantificación de la diferenciación mediante la expresión de los genes de actina y cadena pesada de miosina (Seiler *et al.*, 2004); o la cuantificación de la diferenciación inducida a células endoteliales mediante genes
15 marcadores específicos de dicho linaje (Festag *et al.*, 2007a).

El documento WO97/01644 describe un método para la identificación de compuestos con actividad teratogénica basado en la capacidad de dichos compuestos de interferir en la expresión de genes que se encuentran bajo control de un promotor asociado a la diferenciación celular en células madre embrionarias de rata o ratón en las que se ha
20 inducido un proceso de diferenciación.

WO97/13877 describe un método para evaluar la toxicidad de un compuesto en un organismo mediante la determinación de un perfil de expresión genética de una serie de tejidos seleccionados.

25 WO0034525 describe un método para la identificación de la embriotoxicidad de compuestos químicos mediante la determinación del perfil de expresión génica en un cuerpo embrionario.

No obstante, a pesar de los avances en el desarrollo de métodos *in vitro* para determinar la embriotoxicidad de productos químicos, todavía hay una necesidad de desarrollar métodos de ensayo que superen los inconvenientes de
30 los métodos conocidos en el estado de la técnica.

Compendio de la invención

35 En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar la embriotoxicidad de un compuesto que comprende

(i) poner en contacto dicho compuesto con una célula madre pluripotente que comprende al menos una secuencia codificante que se encuentra bajo el control operativo del promotor del gen de la esterasa diana de
40 neuropatía (NTE) y

(i) determinar los niveles de expresión de dicha secuencia codificante

en donde una alteración en los niveles de expresión de dicha secuencia codificante con respecto a los niveles
45 observados en ausencia de dicho compuesto es indicativo de que el compuesto es embriotóxico, en donde si la célula madre pluripotente es una célula embrionaria de origen humano, esta célula se ha obtenido mediante un método que no implica la destrucción del embrión.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un polinucleótido que codifica
50 una proteína de interés en donde dicho polinucleótido se encuentra bajo el control del promotor del gen NTE, en donde dicho polinucleótido de interés no comprende una secuencia que codifica NTE, en donde si la célula madre pluripotente es una célula embrionaria de origen humano, esta célula se ha obtenido mediante un método que no implica la destrucción del embrión.

55 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con el uso de una célula de la invención para la determinación de la embriotoxicidad de un compuesto.

Breve descripción de las figuras

60 Figura 1: Actividad enzimática NTE y expresión del gen Pnpla 6 en células D3 en monocapa durante la diferenciación espontánea.

Figura 2: Expresión del gen Pnpla 6 en cuerpos embrionarios de células D3 expuestos 23 días a 5-fluoracilo 0.2
65 μM .

Descripción detallada de la invención**Método de la presente invención**

5 Los autores de la presente invención han observado que, de forma sorprendente, la expresión del gen que codifica la esterasa diana de neuropatía (en adelante NTE) en células embrionarias sufre una disminución en la expresión cuando las células son puestas en contacto con un agente embriotóxico. En concreto, el ejemplo de la presente invención demuestra que la expresión de NTE disminuye un 60% en células embrionarias que han sido puestas en contacto con 5-fluorouracilo durante 23 días. Este hallazgo permite el uso del gen NTE como marcador de embriotoxicidad. Así, en 10 un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar la embriotoxicidad de un compuesto que comprende

(i) poner en contacto dicho compuesto con una célula madre pluripotente que comprende al menos una secuencia codificante que se encuentra bajo el control operativo del promotor del gen de la esterasa diana de neuropatía (NTE) y 15

(ii) determinar los niveles de expresión de dicha secuencia codificante

en donde una alteración en los niveles de expresión de dicha secuencia codificante con respecto a los niveles observados en ausencia de dicho compuesto es indicativo de que el compuesto es embriotóxico y en donde si la célula madre pluripotente es una célula embrionaria de origen humano, esta célula se ha obtenido mediante un método que no implica la destrucción del embrión. 20

Los términos “embriotoxicidad”, “toxicidad al desarrollo” y equivalentes gramaticales de los mismos se usan de forma indistinta en la presente invención para referirse a la propiedad de un agente o compuesto de provocar alteraciones moleculares, celulares, morfológicas, histopatológicas o funcionales en el desarrollo de un embrión o un feto cuando dicho embrión o feto es expuesto a dicho agente. Dichas alteraciones pueden ser severas, de forma que resulten en la muerte del embrión o feto o leves, en cuyo caso se manifiesta en alteraciones en el animal adulto, en cuyo caso se dice que dichos compuestos presentan “teratogenicidad”. 25

Los términos “compuesto” y “sustancia” se usan indistintamente en la presente invención e incluyen, sin limitación, agentes terapéuticos (o agentes potencialmente terapéuticos), agentes que muestran una actividad tóxica conocida del tipo de neurotoxina, toxinas hepáticas, toxinas de células hematopoyéticas, micotoxinas, carcinógenos, teratógenos. Los compuestos pueden ser compuestos agroquímicos del tipo de plaguicidas, fungicidas, nematocidas, fertilizantes. Alternativamente, los compuestos pueden ser cosméticos, incluyendo los denominados cosmeceúticos, productos de desecho industrial o contaminantes ambientales. 30

Compuestos que se pueden ensayar en el método de la presente invención incluyen todo tipo de compuestos, incluyendo, compuestos usados en la industria textil, reactivos de laboratorio, compuestos industriales, compuestos médicos, compuestos de la industria papelera, de la industria peletera así como productos de consumo tales como lejías, de aseo, de limpieza, jabones en polvo y líquidos, limpiadores de tejidos, de ventanas, de hornos, de suelos, de cuartos de baño, de cocinas y de moquetas, detergentes de lavavajillas, agentes reductores de la dureza del agua, agentes antical, quitamanchas, barnices, pinturas, limpiadores de pinturas, colorantes, pegamentos, disolventes, ambientadores, insecticidas y similares. 35

En una primera etapa del método de la invención, se pone en contacto el compuesto a ensayar con una célula madre pluripotente que comprende al menos una secuencia codificante que se encuentra bajo el control operativo del promotor del gen de la esterasa diana de neuropatía (NTE) en donde si la célula madre pluripotente es una célula embrionaria de origen humano, esta célula se ha obtenido mediante un método que no implica la destrucción del embrión. 40

El experto en la materia apreciará que las células madre que comprende al menos una secuencia codificante que se encuentra bajo el control operativo del promotor del gen de la esterasa diana de neuropatía (NTE) incluyen tanto aquellas no modificadas genéticamente, en cuyo caso la secuencia codificante es la del propio gen NTE o, alternativamente, células madre embrionarias modificadas genéticamente mediante la introducción de una construcción que comprende una secuencia codificante de un gen reportero que se encuentra bajo control operativo del promotor del gen NTE. 45

Los términos “célula madre pluripotente” o “célula troncal pluripotente” y equivalentes gramaticales se usan de forma indistinta en el contexto de la presente invención para referirse a células no diferenciadas o poco diferenciadas, de cualquier especie, con capacidad para dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y capaces de formar cualquier célula de los tres linajes embrionarios (mesodermo, endodermo, ectodermo) y linaje germinal así como el linaje germinal cuando se cultivan en ciertas condiciones células. La invención contempla el uso de cualquier tipo de célula madre pluripotente que sea capaz de generar una progenie de cualquiera de las tres capas germinativas incluyendo células derivadas de tejido embrionario, tejido fetal, tejido adulto y otras procedencias. Células pluripotentes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen células madre embrionarias, células de carcinoma embrionario, células pluripotentes inducidas (iPS) y células germinales primordiales. Asimismo, la invención contempla el uso de células madre pluripotentes de cualquier especie incluyendo, sin limitación, células humanas, de ratón, de rata, bovinas, de oveja, de hámster, de cerdo y similares. 50

ES 2 363 398 A1

El término “célula pluripotente inducida (iPS)”, según se usa en la presente invención, se refiere a células que son sustancialmente idénticas genéticamente a una célula somática diferenciada de la que derivan pero que muestran características similares en cuanto a pluripotencialidad y capacidad proliferativa a las células madre embrionarias. Típicamente, las iPS expresan en su superficie uno o varios marcadores seleccionados del grupo formado por SSEA-3, SSEA-4, TRA-I -60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E y Nanog. Típicamente, las iPS expresan uno o varios genes seleccionados del grupo de Oct-3/4, Sox2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPP A2, DPP A4 y hTERT. Las iPS pueden generarse usando métodos descritos en el estado de la técnica tales como los métodos descritos por Takahashi y Yamanaka (Cell, 2006, 126:663-676), Yamanaka *et al.* (Nature, 2007, 448:313-7), Wernig *et al.* (Nature, 2007, 448:318-24), Maherali (Cell Stem Cell, 2007, 1:55-70); Maherali y Hochedlinger (Cell Stem Cell, 2008, 3:595-605), Park *et al.* (Cell, 2008, 134:1-10); Dimos *et al.* (Science, 2008, 321:1218-1221), Blieloch *et al.* (Cell Stem Cell, 2007, 1:245-247); Stadtfeld *et al.* (Science, 2008, 322:945-949) y Okita *et al.* (Science, 2008, 322: 949-953). Típicamente, las células iPS se obtienen a partir de células somáticas mediante la expresión en dichas células de las proteínas Oct- 3/4 y Sox2, de las proteínas Oct-3/4, Sox2 y Klf4 polypeptides, de las proteínas Oct-3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc polypeptides y/o de las proteínas Oct-4, Sox2, Nanog y LIN28 polypeptides.

El término “célula germinal primordial” según se usa en la presente invención, se entiende como una célula que deriva del tejido reproductivo de un macho o un hembra adulto y que es capaz de generar células madre de la línea germinal y su progenie tal y como se demuestra por su capacidad de repoblar tejidos ováricos o testiculares estériles tras, por ejemplo, radiación o quimioterapia. Las células germinales primordiales pueden ser quiescentes o dividirse activamente en tejidos reproductivos adultos.

En una forma preferida de realización, las células madre pluripotentes son células madre embrionarias (en adelante, células ES o “embryonic stem”). Las células madre embrionarias (“ES”) proceden de la masa celular interna (ICM) del blastocisto de los mamíferos (Evans y Kaufman, Nature 292:154-156, 1981; Martin, Proc. Natl. Acad. EE.UU. 78:7634-7638, 1981.). Las células madre embrionarias son capaces de proliferar indefinidamente *in vitro* manteniéndose en un estado indiferenciado y con un cariotipo normal a través del cultivo prolongado. También tienen la capacidad de diferenciarse células de las tres capas germinales embrionarias (mesodermo, endodermo y ectodermo; Itskovitz-Eldor, *et al.*, Mol. Med. 6:88-95, 2000) y linaje germinal. Las células madre embrionarias representan un modelo de sistema de gran alcance para la investigación de los mecanismos que subyacen a la biología de células pluripotentes y la diferenciación en el embrión temprano, así como proporcionar oportunidades para la manipulación genética. Las células madre embrionarias han sido aislados de la MCI de embriones en estadio de blastocisto especies múltiples (Bhattacharya, *et al.*, BMC Dev. Biol. 5:22, 2005), incluidos los ratones (Solter y Knowles, Proc. Natl. Acad. EE.UU. 75:5565-5569, 1978.), porcina (Chen, *et al.*, Theriogenology 52:195-212, 1999), los primates no humanos (Thomson, *et al.*, Proc. Natl. Acad. EE.UU. 92, 7844-7848, 1995), y los seres humanos (Reubinoff, *et al.*, Nat. Biotechnol. 18:399-404, 2000; Mandal, *et al.*, Diferenciación 74:81-90, 2006).

El término células ES incluye células embrionarias de varios tipos, ejemplificadas por células embrionarias humanas tales como las descritas por Thomson *et al.* (Science 282 (1998), 1145); células embrionarias humanas de otros primates, tales como células embrionarias de macacos rhesus (Thomson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7844), células embrionarias de tíf (Thomson *et al.*, Biol. Reprod. 55 (1996), 254) y células embrionarias germinales (hEG) (Shambloft *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), 13726). Preferiblemente, la presente invención contempla el uso de células troncales embrionarias que presentan un cariotipo normal. Células embrionarias humanas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que son positivas para al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o la totalidad de los siguientes marcadores: SSEA-3 (stage-specific embryonic antigen-3), SSEA-4; TRA 1-60; TRA 1-81; Oct-4; GCTM-2; y fosfatasa alcalina.

Preferiblemente, la invención contempla el uso de células madre embrionarias procedentes de líneas celulares establecidas de origen humano tales como las líneas ACT-14, AS034, AS034.1, AS034.2, AS038, AS079, AS094, BGO1, BG02, BG03, BG04, CHOI, CH02, CLS1, CLS2, CLS3, CLS4, ESO1, ES02, ES03, ES04, ES05, ES06, ESMO1, ESMO2, ESMO3, FC018, FES 21, FES 22, FES 29, FES 30, GEO1, GE07, GE09, GE13, GE14, GE91, GE92, hES-NCL1, HS181, HS207, HUES1, HUES10, HUES11, HUES12, HUES13, HUES14, HUES15, HUES16, HUES17, HUES2, HUES3, HUES4, HUES5, HUES6, HUES7, HUES8, HUES9, H9, KhES-I, KhES-2, KhES-3, MBO1, MB02, MB03, Miz-hES1, Miz-hES10, Miz-hES11, Miz-hES12, Miz-hES1 3, Miz-hES14, Miz-hES15, Miz-hES2, Miz-hES3, Miz-hES4, Miz-hES5, Miz-hES6, Miz-hES7, Miz-hES8, NCO1, NCO2, NCO3, ReliCellhES1, RH1, RH3, RH4, RH5, RH6, RH7, RL05, RL07, RL10, RL13, RL15, RL20, RL21, Royan H1, SAOO1, SA002, SA002.5, SA046, SA085, Sa111, SA121, SA142, SA167, SA181, SA191, SA196, SA202, SA203, SA211, SA218, SA240, SA279, SA348, SA352, SA399, SA611, SI-100, SI-101, SI-102, SI-103, SI-104, SI-105, SM 06, SI-107, SI-108, SI-109, SI-110, SI-111, SM 14, SM 15, SM22, SI-123, SI-124, SI-125, SI-126, SM28, SI-130, SI-131, SI-132, SI-133, SI-134, SM35, SI-137, SI-138, SM39, SI-140, SM41, SI-144, SI-145, SI-146, SM48, SI-149, SI-15, SI-150, SI-151, SI-153, SI-154, SI-155, SI-156, SM57, SI-158, SI-159, SM60, SM61, SI-162, SI-163, SI-164, SI-165, SI-167, SI-168, SI-169, SI-170, SI-171, SI-172, SI-174, SI-175, SI-176, SI-177, SI-178, SI-179, SI-18, SI-180, SI-182, SI-183, SI-184, SI-185, SI-186, SI-187, SI-188, SI-189, SI-191, SI-192, SI-193, SI-194, SI-195, SI-196, SI-197, SI-198, SI-199, SI-200, SI-201, SI-202, SI-203, SI-204, SI-205, SI-206, SI-208, SI-209, SI-21, SI-210, SI-211, SI-213, SI-214, SI-215, SI-216, SI-217, SI-221, SI-24, SI-27, SI-28, SI-31, SI-33, SI- 53, SI-60, SI-62, SI-63, SI-79, SI-80, SI-81, SI-93, SI-94, SI-95, SI-96, SI-97, SI-98, SI-99, SNUhES1, SNUhES2, SNUhES3, TE-03, TE-04, TE-06, TE-07, TE-32, TE- 33, TE-62, TE-72, UCO1, UCO6, VAL-1, VAL-2, VAL-3, VAL-4, WAO1, WA07, WA09, WA13 o WA14, todas las cuales se encuentran disponibles en repositorios públicos.

ES 2 363 398 A1

Aún más preferiblemente, la invención contempla el uso de células madre embrionarias procedentes de líneas celulares establecidas de origen murino tales como las líneas 59B5, 36.5, 9TR#1, TK#1, ES-D3 [D3], YS001, ES-E14TG2a, ES-D3, 10P12, 56B3, L Wnt-3A, OP9, 3T3 MEFs WT, 3T3 MEFs KO, 127TAG, 151TAG, WPE-stem, NE-4C, NE-GFP-4C, ES-C57BL/6, J1, R1, RW.4, B6/BLU, SCC#10, EDJ#22, AB2.2, Ainv15, 7AC5/EYFP, R1/E, G-Olig2, CE-1, CE3, y hESC BG01V todas las cuales se encuentran disponibles en repositorios públicos.

Métodos para la obtención de células madre embrionarias son ampliamente conocidos y pueden ser puestos en práctica por el experto sin necesidad de experimentación excesiva. Así, células embrionarias humanas se pueden obtener tal y como se describe en *Reprod. Biomed. Online* 4 (2002), 58-63. Células embrionarias de primates se pueden aislar de blastocistos de distintas especies de primates (Thomson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844). Células embrionarias germinales se pueden preparar a partir de células germinales primordiales presentes en fetos humanos de 8-11 semanas tras el último periodo menstrual usando métodos tales como el descrito por Shambloott *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), 13726.

Con el fin de evitar el uso de embriones humanos, es posible el uso de animales transgénicos no humanos como fuente de células madre embrionarias. En particular, U.S. Pat. No. 5,523,226 describe métodos para generar credos transgénicos que pueden ser usados como donantes paraxenotransplantes ahúmanos. WO97/12035 describe métodos para producir animales transgénicos adecuados para xenotransplantes. Asimismo, WO01/88096 describe tejidos animales inmunocompatibles. Estos animales inmunocompatibles se pueden usar para generar células embrionarias pluripotentes tal y como se ha descrito en US6,545,199.

Asimismo, es posible el uso de líneas de células troncales embrionarias, que pueden ser de distinto origen. En una forma de realización, las líneas celulares son de ratón e incluyen células tales como la línea R1 (ATCC No. SCRC-1011) descrita por Nagy *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:8424-8428) y la línea celular D3.

Las células madre pluripotentes pueden ser propagadas de forma continua en cultivo usando una combinación de condiciones de cultivo que promueve la proliferación a la vez que inhibe o retrasa la diferenciación.

En principio, las células madre pluripotentes para su uso en el método de la presente invención pueden ser cultivadas en cualquier medio de cultivo adecuado que permita la proliferación celular y mantenga la capacidad de las células de diferenciarse. Medios adecuados incluyen:

- medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), Gibco, #12440-053;
- medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco #11965-092;
- Medio de Dulbecco modificado de Eagle de Knockout (KO DMEM), Gibco #10829-018.
- medio MAPC (60% de DMEM-baja glucosa, MCDB 201 al 40%, insulina, transferrina, y suplemento de selenio (insulina 0.01 mg/ml; transferrina 0.0055 mg/ml y selenito sódico 0.005 micro g/ml, 1x ácido linolénico/albumina, (albumina 1 mg/mL; 2 moles de ácido linoleico por cada mol de albumina), dexametasona 1 nM, 2% de suero de ternera fetal, M ácido ascórbico 10^{-4} M y 10 micro g/ml de gentamicina);
- medio FBM (medio MCDB 202 modificado, 2% de suero bovino fetal, 5 μ g/ml insulina, 50 mg/ml de gentamicina y 50 ng/ml de amfotericina B),
- medio ES (40% de DMEM, 40% de medio F12, 2 mM de L-glutamina, 1x de amino ácidos no esenciales (Sigma, Inc., St. Louis, MO), 20% de Knockout Serum Replacement™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), y 10 μ g/ml gentamicina)
- medio ES condicionado con fibroblastos embrionarios murinos (MC-ES), que se prepara típicamente a partir de medio ES mediante su condicionamiento con fibroblastos embrionarios murinos tratados con mitomicina C, recogido, filtrado a través de un filtro de 0.45 μ m y suplementado con aproximadamente beta mercaptoethanol 0.1 mM, bFGF o FGF-210 ng/ml y, opcionalmente, 10 ng/ml activin A a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml. Alternativamente, es posible el uso de fibroblastos embrionarios murinos irradiados en lugar de los tratados con mitomicina C.
- mTeSR (Ludwig *et al.* 2006, *Nat Biotechnol*, 24:185-187).

Las condiciones de cultivo no son esenciales para el método de la invención siempre que se garantice la viabilidad de las células pluripotentes. Así, es posible el cultivo de las células en una atmósfera de CO₂ a concentraciones que pueden oscilar entre un 1 y un 6%. Preferiblemente, se usa el medio IMDM con un 20% de suero bovino fetal con un 5% de CO₂, el medio DMEM con un 20% de suero bovino fetal con un 7% de CO₂. También es posible el cultivo de las células realizando un número variable de cambios en el medio de cultivo. Así, la invención contempla que las células de la invención sean cultivadas en MAPC, FBM, MC-ES, o mTeSR™ antes y/o durante la puesta en contacto con los factores de inducción para después ser cultivadas en medios MC-ES o mTeSR™ posteriormente durante el proceso de inducción.

En aquellos casos en los que las células se cultivan en medios con baja o elevada concentración de suero, es posible la adición al medio de cultivo de uno o más factores de crecimiento tales como el FGF-2, bFGF, PDGF, EGF, IGF o insulina. Otros factores de crecimiento que pueden ser usados para suplementar el medio de cultivo incluyen, sin limitación, TGF β -1, Activina A, Noggin, BDNF, NGF, Neurotrofina (NT-1, NT-2 o NT-3).

5

Otras condiciones de cultivo adecuadas para expandir las células para su uso en el método de la presente invención pueden ser determinadas usando métodos estándar conocidos para un experto en la materia.

Típicamente, las células madre pluripotentes se cultivan sobre una capa de células alimentadoras (*feeder cells*), preferiblemente fibroblastos que pueden proceder de tejido embrionario o fetal. Las líneas celulares que se usan como alimentadoras se siembran a casi confluencia y son tratadas de forma que cesen de proliferar (típicamente por irradiación). A continuación se usan como soporte para el cultivo de células madre pluripotentes (por ejemplo Koopman and Cotton, Exp. Cell 154 (1984), 233-242; Smith and Hooper, Devel. Biol. 121 (1987), 1-91).

El término “células alimentadoras” se usa para describir células de un tipo que se co-cultiva con células de un segundo tipo para proporcionar un entorno en el que las células del segundo tipo puedan crecer. Las células alimentadoras son preferiblemente de una especie distinta a las de las células a las que dan soporte. Preferiblemente, las células madre embrionarias se cultivan sobre fibroblastos de ratón inmortalizados, tales como las células de ratón STO (Martin and Evans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72:1441-1445) que se encuentran disponibles comercialmente (ATCC CRL 1503) o fibroblastos humanos diferenciados a partir de células troncales embrionarias humanas.

Alternativamente, es posible hacer crecer las células en ausencia de células alimentadoras. La expresión “en ausencia de células alimentadoras” se entiende, según se usa en la presente invención, a condiciones de cultivo en donde el medio de cultivo no contiene células alimentadoras añadidas expresamente o en donde el medio de cultivo no ha sido previamente condicionado mediante su puesta en contacto con un cultivo de células alimentadoras. Se entiende que si el cultivo de células pluripotentes para llevar a cabo el método de la invención procede de un cultivo original que se había cultivado sobre células alimentadoras, es posible que el cultivo contenga una cantidad residual de células alimentadoras sin que éstas hayan sido expresamente añadidas a dicho cultivo. Para ello, el cultivo requiere típicamente el uso de medios de cultivos condicionados tales como los descritos por Xu C. *et al.* (Nat Biotechnol., 2001, **19**: 971-74), Rosler ES *et al.* (Dev Dyn 2004; **229**: 259-74), Amit M. *et al.* (Biol Reprod., 2004; **70**: 837-45) y/o el uso de placas de cultivo recubiertas de componentes de la matriz celular, tales como el método descrito por Klimanskaya, I. *et al.* (The Lancet, 2005, <http://image.thelancet.com/extras/04art11036web.pdf>).

En general, la expresión de un gen a través de un promotor requiere la presencia de factores de transcripción capaces de reconocer secuencias de unión en dicho promotor. Así, las células troncales embrionarias que pueden ser objeto de la presente invención incluyen todas aquellas células troncales embrionarias que expresen los factores de transcripción necesarios para la activación transcripcional del promotor objeto de estudio. Aunque es posible reconstituir la expresión de dichos reporteros en células de muy distinto origen, es preferible el uso de células troncales embrionarias que expresan dichos factores de transcripción de forma endógena y constitutiva. Así, en una forma preferida de realización, las células troncales embrionarias objeto de estudio incluyen células troncales embrionarias eucariotas superiores, preferentemente células de mamíferos.

En una forma preferida de realización, la determinación de los niveles de expresión de la secuencia codificante que se encuentra acoplada operativamente al promotor de NTE se lleva a cabo en una célula madre embrionaria que forma parte de un cuerpo embrionario.

El término “cuerpo embrionario”, según se usa en la presente invención, se refiere a agregados formados por células diferenciadas y no diferenciadas que se forman cuando las células ES se mantienen en cultivo en suspensión. Los cuerpos embrionarios comprenden una mezcla de distintos tipos celulares, típicamente de distintas capas germinales. En condiciones de cultivo adecuadas para la formación de cuerpos embrionarios (por ejemplo, en ausencia de factor inhibidor de leucemia o LIF), las células ES proliferan y forman pequeños agregados de células que empiezan a diferenciarse. En la primera fase de la diferenciación, correspondiente a los días 1-4 en el caso de humanos, el agregado está formado por una capa de células endodérmicas en la capa externa, denominándose “cuerpo embrionario sencillo”. En la segunda fase, correspondiente a los días 3-20 de la diferenciación, se forman “cuerpos embrionarios complejos” caracterizados por la diferenciación de células del endodermo y mesodermo y tejidos derivados. En la presente invención, el término “cuerpo embrionario” incluye tanto el “cuerpo embrionario sencillo” como el “cuerpos embrionario complejo”. La determinación de la aparición de los cuerpos embrionarios en cultivos de células ES puede ser efectuada de forma rutinaria por un experto, por ejemplo, mediante inspección visual de los cultivos. Masas flotantes de al menos 20 células se consideran cuerpos embrionarios (Schmitt *et al.*, Genes Dev. 5 (1991), 728-740; Doetschman *et al.* J. Embryol. Exp. Morph. 87 (1985), 27-45). Se entiende que el término “cuerpo embrionario” incluye poblaciones de células, la mayoría de las cuales son pluripotentes que son capaces de desarrollarse en distintas líneas celulares cuando se cultivan en condiciones adecuadas. El término se usa también para referirse a estructuras similares que se forman a partir de cultivos de células germinales primordiales, que son células no diferenciadas obtenidas de las regiones gonadales de embriones. Las células primordiales germinales, cuando se tratan con distintos factores, son capaces de formar células ES pluripotentes que a su vez pueden formar cuerpos embrionarios, tal y como se describe en US5670372 y en Shamblott, *et al.*, *supra*.

ES 2 363 398 A1

En una forma preferida de realización, las células madre embrionarias que se usan en la primera etapa del método de la invención son aquellas en las que la secuencia codificante que se encuentra bajo el control operativo del promotor del gen NTE o Pnpla 6 es la secuencia de NTE endógena de la célula.

5 La expresión “secuencia codificante”, según se usa en la presente invención se refiere a una secuencia de amino ácidos formada por codones que pueden ser traducidos para dar lugar a una proteína concreta.

La expresión “promotor”, según se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia que es capaz de aportar un sitio de unión para la ARN polimerasa y promover así el inicio de la transcripción de una segunda secuencia que se encuentra unida operativamente a dicho promotor.

Los términos “esterasa diana de neuropatía”, “NTE”, “Pnpla6”, “PLP6” o “patatin-like phospholipase domain containing 6”, “NTEMND”, “SPG39” se usan de forma indistinta en la presente invención para referirse al gen que codifica una proteína con actividad esterasa y que se incluye dentro de la clasificación bajo el epígrafe EC 3.1.1.5. El método de la invención incluye la determinación de la actividad NTE de origen humano, incluyendo las isoformas a (número de acceso NP_001159583 en NCBI), b (número de acceso NP_006693 en NCBI), c (número de acceso NP_001159584 en NCBI) y d (número de acceso NP_001159586 en NCBI), bovino (número de acceso NP_001070015 en NCBI) y murino (número de acceso NP_056616 en NCBI).

20 La región del gen NTE que puede ser usada para regular la expresión del gen reportero de acuerdo con los métodos de la presente invención incluye la región del cromosoma 19 que se encuentra en posición 5' con respecto a la secuencia que codifica el ARNm de NTE definida por el número de acceso NG_013374 en la base de datos NCBI.

Por otro lado, a partir de esta secuencia del promotor del gen NTE de origen humano pueden obtenerse las regiones promotoras de los genes homólogos de dicho gen en otras especies animales merced al conocimiento general existente de las técnicas de biología molecular. Todas estas secuencias de nucleótidos homologas a la descrita en la presente invención y que mantengan sustancialmente la capacidad de regular la expresión transcripcional de la secuencia de nucleótidos operativamente acoplada aguas abajo de dicha secuencia en células troncales embrionarias o células troncales de carcinoma embrionario forman parte de la presente invención. En el marco de la presente invención se entiende como secuencias homologas aquellas secuencias de nucleótidos que presentan un grado de similitud de al menos un 80% con las secuencias de nucleótidos del promotor de la presente invención. Preferentemente, aquellas que presentan un grado de similitud de al menos un 85%. Más preferentemente, aquellas que presenten un grado de similitud de al menos un 90% con las secuencias de nucleótidos del promotor de la presente invención y aún más preferentemente aquellas secuencias que presenten un grado de similitud de al menos un 95%. Los algoritmos para el análisis de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST, descrito en Altschul *et al.* (1990) (*J Mol Biol.* Oct 5;215(3):403-10).

Dentro del marco de la presente invención, también se incluyen aquellas secuencias de nucleótidos que hibridan con la secuencia de nucleótidos de la invención del promotor NTE. Las condiciones bajo las cuales hibridan cadenas de ácidos nucleicos totalmente complementarias se denominan “condiciones muy severas de hibridación” o “condiciones de hibridación específicas de secuencia”. No obstante, se pueden obtener cadenas dobles estables de ácidos nucleicos sustancialmente complementarias bajo condiciones de hibridación menos severas, denominadas genéricamente “condiciones severas de hibridación”, en cuyo caso, el grado de desapareamiento tolerado puede ajustarse mediante ajuste apropiado de las condiciones de hibridación. El experto en la materia puede determinar empíricamente la estabilidad de un dúplex teniendo en cuenta diversas variables, tales como, la longitud y concentración de pares de bases de las sondas, la fuerza iónica y la incidencia de los pares de bases desapareados, siguiendo las directrices del estado de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); y Wetmur, *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.* 26 (3/4):227-259 (1991)). A modo ilustrativo, en una realización particular, las condiciones severas de hibridación comprenden, por ejemplo, una concentración comprendida entre 0,15 M y 0,9 M de NaCl y una temperatura comprendida entre 20°C y 65°C. En otra realización particular, las condiciones muy severas de hibridación comprenden, por ejemplo, una concentración comprendida entre 0,02 M y 0,15 M de NaCl y una temperatura comprendida entre 50°C y 70°C.

En el caso de que se usen células modificadas genéticamente mediante la introducción de un promotor de NTE acoplado a la secuencia de un gen reportero, es necesario la generación de las células que presentan dicha alteración genética. Para ello, es necesario incorporar en dicha célula la construcción de ADN que comprende el promotor del gen NTE o una variante funcionalmente equivalente de la misma y un gen reportero acoplado operativamente a dicha región promotora. Esta construcción de ADN se introduce en las células objeto de estudio usando cualquiera de los métodos de transfección conocidos para el experto en la materia (véase secciones 9.1 a 9.5 en Ausubel, F.M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc; ringbou edition, 2003). En particular, las células se pueden transfectar mediante co-precipitación de ADN con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, polibreon, electroporación, microinyección, fusión mediada por liposomas, lipofección, infección por retrovirus y transfección biolística. En un caso particular, las líneas de hESCs se transfectan mediante nucleofección. La nucleofección se puede realizar con un equipo Nucleofector de Amaxa utilizando el Kit II para nucleofección de hESCs (Amaxa).

En una realización particular de la invención, dicha célula hospedadora expresa de forma transitoria dicha construcción de ADN. En otra realización particular, dicha célula expresa de forma estable dicha construcción de ADN. Así, con el fin de obtener expresión estable de la construcción de ADN objeto de la invención, es necesario incluir en

la transfección un gen que codifique para resistencia a un determinado antibiótico, de forma que se puedan seleccionar aquellas líneas celulares que han incorporado el ADN en el genoma de aquellas líneas celulares en las que el ADN se encuentra en posición extracromosómica. El gen que permite seleccionar las células se puede aportar formando parte del mismo vector que contiene la construcción objeto de la invención o, alternativamente, se puede aportar separadamente mediante co-transfección con un segundo plásmido que contiene dicho gen de resistencia. En este último caso, el plásmido que contiene la construcción de ADN se aporta a la mezcla de transfección en un exceso molar con respecto al gen de resistencia de forma que por cada evento de integración del gen de resistencia exista una alta probabilidad de integración del gen que contiene el promotor objeto de estudio. Preferiblemente, el plásmido que contiene la construcción de ADN se aporta en un exceso de al menos 5 veces con respecto al vector que contiene el reportero de resistencia.

Marcadores de resistencia adecuados para seleccionar líneas celulares que han integrado la construcción en el genoma incluyen marcadores de selección positiva como por ejemplo el gen de resistencia a geneticina, el gen de resistencia a la neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G418, el gen de la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina, el gen ODC, que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa (2-(difluorometil)-DL-ornitina (DFMO), el gen de la dihidrofolato reductase que confiere resistencia a metrotexato, el gen de la puromicina-N-acetil transferasa, que confiere resistencia a puromicina, el gen ble que confiere resistencia a zeocina, el gen de la adenosina deaminasa que confiere resistencia a 9-beta-D-xilofuranosil adenina, el gen de la citosina deaminasa, que permite a las células crecer en presencia de *N*-(fosfonacetil)-L-aspartato, timidina kinasa, que permite a las células crecer en presencia de aminopterina, el gen de Xantina-guanina fosforibosiltransferasa, que permite a las células crecer en presencia de xantina y ausencia de guanina, el gen *trpB* de *E. coli* que permite a las células crecer en presencia de indol en lugar de triptófano, el gen *hisD* de *E. coli*, que permite a las células el usar histidinol en lugar de histidina. El gen de selección se incorpora en un plásmido que puede incluir, adicionalmente, un promotor adecuado para la expresión de dicho gen en células eucariotas (por ejemplo, los promotores CMV o SV40), un sitio optimizado de iniciación de la traducción (por ejemplo un sitio que sigue las denominadas reglas de Kozak o un IRES), un sitio de poliadenilación como, por ejemplo, el sitio de poliadenilación del SV40 o de la fosfoglicerato quinasa, intrones como, por ejemplo, el intrón del gen de la beta-globulina.

El proceso de selección de células que contienen la construcción de ADN de interés integrada de forma estable en el genoma se lleva a cabo mediante un proceso de selección convencional (véase por ejemplo Ausubel, F.M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1997) 9.5.1-9.5.19). Para ello, se transfectan las células con el vector o mezclas de vectores y, tras un periodo de recuperación, se dejan crecer en un medio selectivo (bien un medio que contiene al antibiótico frente al que el reportero confiere resistencia o bien un medio mínimo que contiene el antimetabolito frente al cual el reportero confiere resistencia). Las colonias celulares que crecen en medio selectivo se aíslan y se vuelven a dejar crecer en medio selectivo. Una vez que se han obtenido células que son capaces de crecer durante repetidos ciclos de proliferación en presencia del marcador de selección, puede ser conveniente el eliminar dicho marcador de las células, particularmente si las células van a ser transfectadas con otro marcador de selección. Para ello, se pueden usar recombinasas, en particular el sistema Cre/Lox. Alternativamente, es posible amplificar el número de copias del marcador de selección, lo que resulta en una amplificación simultánea del número de copias del gen de interés con el consiguiente aumento de su expresión. Para ello, las células se hacen crecer en presencia de concentraciones progresivamente superiores de agente de selección, lo que resulta en una selección de las células que han sufrido una amplificación de los genes que confieren resistencia a tal agente y, normalmente, de las regiones adyacentes o intermedias. Preferiblemente se usa DHFR como marcador de selección y la selección de líneas celulares en las que existe una amplificación de dicho gen se lleva a cabo en presencia de geneticina.

Normalmente, se considera que una célula expresa un marcador de forma estable cuando la expresión de dicho marcador no disminuye con sucesivos ciclos de proliferación, independientemente de la presencia en el medio de cultivo de agente de selección.

Genes reporteros que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP) y variantes de la misma que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda (por ejemplo, DS-Red o proteína fluorescente roja), cloranfenicol acetiltransferasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano.

Una vez que se dispone la célula adecuada para la realización del método de la invención (célula madre embrionaria no modificada genéticamente o célula madre embrionaria modificada mediante la introducción en la misma de una construcción que comprende el promotor del gen NTE que controla operativamente la secuencia de un gen reportero), en una primera etapa del método de la invención, la célula se pone en contacto con el compuesto candidato.

Por "poner en contacto" una célula madre embrionaria con un compuesto candidato se incluye, según la presente invención, cualquier posible forma de llevar el compuesto candidato hasta el interior de la célula que va a ser analizada. Así, en caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente con añadir dicha molécula al medio de cultivo. En caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína), es necesario aportar los medios para que esa molécula pueda acceder al interior celular. En caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico, pueden usarse métodos convencionales para transfección. En caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula puede ponerse en contacto tanto con la proteína directamente como con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permitan su transcripción/traducción una vez que se encuentren en el interior celular. Para

ello, se pueden usar cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para permitir su entrada al interior celular. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con una variante de la proteína que se desea estudiar que ha sido modificada con un péptido que sea capaz de promover la translocación de la proteína al interior celular, tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex y oligómeros de arginina (Lindgren, A. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E. L. y Dowdy, S. F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393). Por otra parte, el compuesto candidato o preparación puede ejercer su efecto sobre la transcripción del gen reportero sin necesidad de entrar al interior celular. Así, dicho compuesto o preparación puede ejercer dicho efecto mediante su unión o interacción con un receptor de membrana de forma que dicha unión desencadena una serie de respuestas celulares (señales de transducción) que incluyen la regulación de la expresión genética, lo que finalmente lleva a la alteración de la expresión del gen reportero.

En un caso particular, el compuesto a ensayar no se encuentra aislado sino que se encuentra formando parte de una mezcla más o menos compleja bien derivada de una fuente natural o bien formando parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden ser ensayadas según el método de la presente invención incluyen, sin limitación, bibliotecas de péptidos incluyendo tanto péptidos como análogos peptídicos que comprenden D-amino ácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos incluyendo ácidos nucleicos con enlaces no fosfodiéster del tipo de fosforotioato o ácidos nucleicos peptídicos, bibliotecas de anticuerpos, de carbohidratos, de compuestos de bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos, y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, la biblioteca puede haber sido preseleccionada para que contengan compuestos que puedan acceder al interior celular con mayor facilidad. Así, los compuestos de pueden seleccionar en base a determinados parámetros tales como tamaño, lipofilicidad, hidrofiliicidad, capacidad de formar puentes de hidrógeno.

En caso de que el compuesto candidato se encuentre formando parte de una mezcla de mayor o menor complejidad, el método de la invención comprende adicionalmente una o varias etapas de fraccionamiento de la mezcla ensayada y la repetición de los pasos anteriores con cada una de las fracciones obtenidas hasta que se aísla el compuesto en la mezcla. Métodos para el fraccionamiento de compuestos presentes en una mezcla incluyen cromatografía (en capa fina, de gases o de exclusión molecular en gel, de afinidad), cristalización, destilación, filtración, precipitación, sublimación, extracción, evaporación, centrifugación, espectrometría de masas, adsorción y similares.

Alternativamente, los compuestos a ensayar pueden estar formando parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser animal, vegetal obtenido de cualquier entorno, incluyendo, sin limitación, extractos de organismos terrestres, aéreos, marinos y similares.

La puesta en contacto del compuesto a ensayar con la célula madre pluripotente se lleva a cabo preferiblemente en condiciones adecuadas para promover la diferenciación celular. Las células troncales embrionarias se pueden mantener de forma indefinida en cultivo en un estado proliferativo sin diferenciarse en presencia de miembros de la familia de IL6 como, por ejemplo, el factor inhibidor de la leucemia (LIF) tal y como se ha descrito en el estado de la técnica (Cartwright, P. *et al* (2005) *Development* 132, 885-896), Así, en una realización particular del método de la invención, dichas células troncales en cultivo se encuentran en ausencia de LIF. Por otro lado, es también bien conocido en el estado de la técnica que el ácido retinoico induce la diferenciación y la proliferación celular. Métodos para promover la diferenciación de células troncales embrionarias hacia los tres distintos tipos de líneas celulares (endodermo, mesodermo y ectodermo) han sido ampliamente descritos (véase, por ejemplo, Reubinoff BE. *et al.*, 2000, *Nat. Biotechnol.* 18:399-404, Itskovitz-Eldor J. *et al.* 2000, *Mol. Med.* 6:88-95 y Schuldiner M. *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11307-11312) e incluye el uso de uno o más de los factores de crecimiento NGF, HGF, EGF, FGF, ácido retinoico, BMP-4, TGF- β y activina A.

En la segunda etapa del método de la invención, se determina la actividad de la secuencia codificante. El experto en la materia apreciará que dicha determinación puede ser llevada a cabo a distintos niveles. Así, es posible la determinación de los niveles de ARNm codificado por dicha secuencia codificante, se pueden determinar los niveles de proteína resultante de la traducción de la secuencia codificante y, por último, en el caso de que la proteína codificada tenga algún tipo de actividad, es posible determinar la actividad enzimática como indicador del nivel de expresión de dicha secuencia codificante.

En el caso de que la determinación de los niveles de expresión de la secuencia codificante se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles del ARNm correspondiente, cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de dichos ARNm. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de expresión se determinan mediante la cuantificación de los niveles de ARNm codificados por dichos genes. Éstos pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Northern blot y empleo de sondas apropiadas, Northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm de los genes de interés o de su ADNc/ARNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, micromatrices, etc. Análogamente, los niveles del ADNc/ARNc correspondiente a dicho ARNm codificados por los genes marcadores también puede ser cuantificado mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de la síntesis (ARN polimerasa) y amplificación

del ARNc complementario a dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y cols., 2001 "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.

5 El método de la invención puede ser llevado a cabo mediante la determinación de los niveles de ARNm de cualquiera de las variantes de dicho ARNm incluyendo, sin limitación, el ARNm correspondiente a la secuencias descritas en NCBI con números de acceso AJ004832, BC051768 y NM_006702, así como a la variante 1 del transcripto de ARNm (número de acceso NM_001166111 en NCBI), la variante 2 del transcripto de ARNm (número de acceso NM_001166112 en NCBI), la variante 3 del transcripto de ARNm (número de acceso NM_001166113 en NCBI), la
10 variante 5 del transcripto de ARNm (número de acceso NM_001166114 en NCBI). El experto en la materia apreciará que el diseño de sondas y cebadores adecuados para la amplificación y detección del ARNm del gen NTE puede ser llevado a cabo a partir de las secuencias de dichos ARNMs mediante algoritmos estándar de identificación de sondas capaces de hibridar con un ARNm diana en condiciones muy restrictivas. Asimismo, es posible el diseño de sondas capaces de reconocer más de una de las variantes del ARNm de NTE, preferiblemente de la totalidad de las variantes mediante el diseño de sondas y cebadores dirigidos a regiones conservadas en un número variable de variantes del
15 transcrito del gen NTE.

En el caso de que la determinación de los niveles de expresión de la secuencia codificante se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de la proteína correspondiente. Dicha determinación puede llevarse a cabo usando cualquier método convencional. A modo de ejemplo no limitante, los niveles de dicha proteína se puede cuantificar
20 por medio de métodos convencionales, por ejemplo, usando anticuerpos con capacidad para unirse específicamente a la proteína NTE o a la proteína que se encuentra bajo el control operativo del promotor NTE y y posterior cuantificación de los complejos antígeno-anticuerpo resultantes.

25 Los anticuerpos que se pueden emplear en estos ensayos pueden ser, por ejemplo sueros policlonales, sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. Al mismo tiempo, los anticuerpos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos, pero no exclusivos, de marcadores que se pueden usar incluyen isótopos radioactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas,
30 colorantes, etc. Existen una amplia variedad de ensayos bien conocidos que se pueden usar en la presente invención, que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); entre estas técnicas se incluyen Western-blot o inmunotransferencia, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo), EIA (inmunoensayo enzimático) competitivo, DAS-ELISA (ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en uso de biochips o micromatrices de proteína
35 incluyendo anticuerpos o ensayos específicos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras formas de detectar y cuantificar la proteína BRCA1 incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligandos, etc.

En el caso de que la determinación de los niveles de expresión de la secuencia codificante se lleva a cabo mediante la determinación de la actividad enzimática de la proteína codificada por dichas niveles del ARNm correspondiente, esta puede ser llevada a cabo usando cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica incluyendo el método basado en la determinación de la actividad fenil valerato esterasa resistente al organofosforado paraoxón y sensible al organofosforado mipafox tal y como se describe en el ejemplo de la presente invención y en Sogorb *et al.* (Int. J. Cell Biol., 1996, 28:983-989), Sogorb *et al.* (Toxicol. Letter, 1997, 93:95-102), Johnson, M. K. (Arch. Toxicol. 1975, **34**, 259-268), Johnson, M. K. (Arch. Toxicol. 1977, **37**, 113-115), Wu, S.-Y. & Casida, J. E. (Chem. Res. Toxicol., 1995, **8**, 1070-1075), Wu, S.-Y. & Casida, J. E. (Toxicol. Appl. Pharmacol. 1996, **139**, 195-202) and Wu, S.-Y. & Casida, J. E. (Chem. Res. Toxicol., 1994, **7**, 77-81), el método basado en la determinación de la actividad lisofosfolipasa descrito por Quistad *et al.* (J. Biol. Chem., 2003, 100:7983-7987), el método electroquímico usando electrodos de oxígeno de tipo Clark modificados con tirosinasa inmovilizada (Sigolaeva *et al.*, 1999, Chem. Biol. Interact, 14:119-120).
50

En el caso de que la determinación de los niveles de expresión se lleve a cabo en células modificadas genéticamente mediante la introducción de una construcción que comprende un gen reportero bajo el control del promotor del gen NTE, la determinación de la actividad enzimática se llevará a cabo usando una metodología asociada a la actividad enzimática de dicho gen reportero.
55

Así, si el gen reportero codifica una enzima con actividad fosfatasa alcalina, se puede determinar la actividad usando sustratos cromogénicos del tipo del p-nitrofenil fosfato (p-NPP), 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato/tetrazolio nitroblue (BCIP/NPT), Fast-Red/naftol-AS-TS fosfato o sustratos fluorogénicos del tipo de 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), 3,6-fluoresceína difosfato (3,6-FDP), Fast Blue BB, Fast Red TR o sales de diazonio de Fast Red Violet LB.
60

Si el gen reportero codifica una peroxidasa, se puede determinar la actividad usando sustratos cromogénicos del tipo de 2,2-azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilenediamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-amino salicílico, ácido 3-dimetilamino benzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) o sustratos fluorogénicos del tipo del ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazines reducidas y benzotiazines reducidas, incluyendo los reactivos Amplex[®] Red y Amplex UltraRed y los dihidroxantenos reducidos.
65

ES 2 363 398 A1

Si el gen reportero codifica una glucosidasa, se puede determinar la actividad usando substratos cromogénicos del tipo de o-nitrofenil- β -D-galactosido (o-NPG), p-nitrofenil- β -D-galactosido y 4-metilumbeliferil- β -D-galactosido (MUG) para la β -D-galactosidasa y substratos fluorogénicos del tipo de la resorufina beta-D-galactopiranosido, digalactosido de fluoresceína (FDG), diglucurónido de fluoresceína, 4-metilumbeliferil beta-D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil beta-D-galactopiranosido y beta-D-galactopiranosido de cumarina. En una forma preferida de realización, el gen reportero codifica para la luciferasa y la detección se efectúa midiendo la luminiscencia emitida por dicha enzima en presencia de ATP. La luminiscencia se determina usando kits comerciales, como por ejemplo, el kit de enhanced luciferase assay (Analytical Luminescence Laboratory, MI).

Preferiblemente, a la vez que se lleva a cabo la determinación de la actividad del gen reportero en presencia de los compuestos a ensayar, es necesario efectuar determinaciones en paralelo de la actividad transcripcional basal en presencia de únicamente el medio de cultivo y/o del vehículo en el que se encuentra disuelto el compuesto a ensayar o en el que se han preparado los extractos a ensayar de forma que se disponga de un valor de referencia frente al que valorar la expresión del gen reportero en presencia del compuesto candidato.

Por último, el método de la presente invención permite concluir que el compuesto es embriotóxico y/o teratogénico si dicho compuesto provoca una alteración en la expresión de la secuencia codificante que se encuentra bajo control operativo del promotor NTE con respecto a los niveles de expresión que se observan en ausencia de dicho compuesto y/o en presencia de un compuesto control del que se conoce que carece de actividad embriotóxica o teratogénica. Alternativamente, es posible el uso de un compuesto cuya actividad teratogénica se encuentra bien documentada y usar este compuesto como control de forma que el compuesto candidato provoca una alteración en la expresión de la secuencia codificante que es similar a la que se observa cuando las células han sido tratadas con dicho compuesto genotóxico.

El término “alteración de la expresión” se usa según la presente invención, indica cualquier desviación estadísticamente significativa de los niveles de expresión y contempla tanto el aumento como la disminución de la expresión. El experto en la materia puede determinar si una alteración en la expresión es estadísticamente significativa sin más dilación usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

No obstante, en una forma preferida de realización, la puesta en contacto de la célula con el compuesto genotóxico provoca una disminución en la expresión del gen acoplado al promotor de gen NTE, por lo que la alteración en la expresión es una disminución.

El término “disminución” al referirse a la expresión de un polinucleótido se usa en la presente invención para referirse a que el nivel de expresión de la secuencia de referencia es al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100%, al menos un 110%, al menos un 120%, al menos un 130%, al menos un 140%, al menos un 150% inferior al valor que se obtiene cuando las células han sido tratadas en ausencia del compuesto o en presencia de un compuesto control del que se sabe que no tiene actividad genotóxica.

Típicamente, el método de la invención se lleva a cabo en paralelo usando un estándar de toxicidad conocida o compuestos que se sabe que no muestran genotoxicidad. Así, es posible el uso de compuestos altamente embriotóxicos como el 5-fluorouracilo (5-FU), compuestos débilmente embriotóxicos (cafeína) como controles positivos de alta o media embriotoxicidad o no embriotóxicos (penicilina G) como control negativo de no embriotoxicidad. La elección de estos tres compuestos radica en el hecho de que la penicilina no muestra efectos teratogénicos en ratones o humanos (Boucher and Delost, C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 158:528-532, 1964), mientras que 5-FU es un compuesto con actividad citostática que muestra una elevada actividad teratogénica *in vivo* (Shuey, *et al*, *Teratology* 50, 379-386, 1994).

55 Células de la presente invención

Los autores de la presente invención han observado que las células en las que se ha introducido una construcción que comprende un gen reportero que se encuentra operativamente acoplado al promotor del gen NTE constituyen una herramienta adecuada para la determinación de la capacidad genotóxica de un compuesto determinado.

Así, en otro aspecto, la invención se refiere a una célula que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de interés en donde dicho polinucleótido se encuentra bajo el control del promotor del gen NTE, en donde dicho polinucleótido de interés no comprende una secuencia que codifica NTE, en donde si la célula madre pluripotente es una célula embrionaria de origen humano, esta célula se ha obtenido mediante un método que no implica la destrucción del embrión.

Los términos “célula”, “promotor”, “gen NTE” han sido descritos en detalle anteriormente en el contexto del método de la invención y se usan de igual manera para describir la célula de la invención.

ES 2 363 398 A1

En una forma preferida de realización, la célula que comprende el polinucleótido que codifica una proteína de interés bajo el control del promotor del gen NTE es una célula madre pluripotente. En una forma de realización aún más preferida, dicha célula es una célula madre embrionaria. De forma aún más preferida, dicha célula madre embrionaria es de ratón.

Los términos “célula madre pluripotente” y “célula madre embrionaria” han sido explicados en detalle con anterioridad y se aplican igualmente a la célula de la invención. Células madre embrionaria de ratón adecuadas para la realización de la invención incluye cualquiera de las células mencionadas anteriormente en el contexto del método de la invención.

En una forma preferida de realización, el polinucleótido que codifica la proteína de interés es un gen reportero. Cualquiera de los genes reporteros mencionados anteriormente en el contexto del método de la invención sería igualmente aplicable para la obtención de las células de la invención.

Por último, la invención se relaciona con el uso de una célula de la invención para la determinación de la embriotoxicidad de un compuesto. Para ello, la invención contempla la puesta en contacto de dicho compuesto con la célula de la invención seguido de la determinación de la expresión del polinucleótido de interés, en donde dicha determinación puede llevarse a cabo mediante la determinación de los niveles de ARNm, de proteína o de la actividad enzimática de dicha proteína. La puesta en práctica de cada una de los elementos del uso de la invención se lleva a cabo de forma semejante a como se lleva a cabo el método de la invención.

La invención se ilustra a continuación en base a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Cultivo de las células madre embrionarias y generación de los cuerpos embrionarios

Las células ES de ratón de las líneas D3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) (Doetschman *et al.* 1985) y R1 (Mount Sinaí Hospital, Toronto, Cañada) (Nagy *et al.* 1993) se hicieron crecer en estado no diferenciado en placas de 75 mm cuyas superficies se habían tratado con gelatina al 0.1% en PBS y usando medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado por calor (Biotech, Berlin, Germany), amino ácidos no esenciales al 1%, 50 U penicilina/ml, 100 µg estreptomycin/ml (obtenidos de Invitrogen), β-mercaptoethanol 0.1 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 103 U LIF/ml (Millipore, Massachusetts, USA).

Las células diferenciadas se hicieron crecer en un monocapa en una botella de 75-mm tratada con gelatina en medio completo sin LIF durante menos de 21 días. Los cuerpos embrionarios se generaron en 4 ml de medio ESC mediante siembra masiva en medio completo sin LIF durante menos de 37 días.

Ejemplo 2

Expresión de actividad enzimática y génica de NTE en células madre embrionarias de ratón

Se demostró que la actividad enzimática NTE se expresa en células madre embrionarias de ratón de las líneas D3 y R1 cultivadas en monocapa. La actividad enzimática NTE se determinó como la actividad fenil valerato estarasa resistente al organofosforado paraoxón y sensible al organofosforado mipafox y se muestra en la siguiente Tabla 1.

TABLA 1

Actividad enzimática NTE de 2 diferentes líneas de células madre embrionarias de ratón

	nmol fenol / min / 10 ⁶ células	nmol fenol / min / mg proteína
Células línea D3	1.10±0.27 (n=5)	24.9±3.9 (n=5)
Células línea R1	2.45±0.33 (n=2)	72.7±9.8 (n=2)

ES 2 363 398 A1

Ejemplo 3

Curso temporal de la expresión génica y proteica de NTE en células madre embrionarias de ratón

5 La proteína NTE es codificada en ratón por el gen denominado Pnpla 6. Se determinó la expresión del gen Pnpla 6 en células madre embrionarias de ratón de la línea D3 cultivadas en monocapa y en proceso de diferenciación espontánea (en ausencia del factor represor de diferenciación denominado LIF).

10 Se encontró que la expresión del gen Pnpla 6 a las 30 horas de iniciada la diferenciación era unas 8 veces superior a la expresión del mismo gen 6 horas después de iniciada la diferenciación (Figura 1). A partir de este momento se observó una disminución de la expresión del gen Pnpla 6 de modo que 50 horas después de iniciada la diferenciación la expresión del gen era solamente 3.5 veces superior al valor registrado tras 6 horas de cultivo en ausencia de LIF (Figura 1).

15 La actividad enzimática NTE siguió un perfil de expresión temporal similar, ya que la actividad enzimática tras 30 horas de diferenciación fue un 52% superior a la actividad enzimática registrada 18 horas antes, mientras que tras 48 horas de diferenciación la actividad enzimática NTE fue del mismo orden que la registrada 36 horas antes.

20 Los experimentos demuestran que la actividad enzimática NTE y el gen que la codifica se expresa en células madre embrionarias de ratón y que además la expresión varía durante la diferenciación espontánea.

Ejemplo 4

Efecto del 5-fluoracilo sobre la expresión génica de NTE

Se estudió el efecto del 5-fluoracilo (5-FU), un compuesto químico considerado como un embriotóxico fuerte, sobre la expresión del gen Pnpla 6 (gen codificante para la proteína NTE).

30 Para ello se generaron cuerpos embrionarios en suspensión de células madre embrionarias de ratón de la línea D3 que se expusieron durante 23 días a 0.2 μ M de 5-FU. Transcurrido este tiempo se determinó la expresión del gen Pnpla6 mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados se compararon con una muestra control donde se determinó la expresión de Pnpla6 en cuerpos embrionarios de la misma edad no expuestos a 5-FU. Los resultados se muestran en la Figura 2.

35 La expresión del gen Pnpla6 se redujo aproximadamente un 60% en los cuerpos embrionarios de las células expuestas a 5-FU. Las diferencias con la muestra control fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

40 Se concluye que la exposición al agente embriotóxico 5-FU reduce la expresión del gen Pnpla6 codificante de la proteína NTE, lo que sugiere que las alteraciones de la expresión génica o proteica de NTE podrían ser utilizadas como parámetro indicador para detectar propiedades embriotóxicas de sustancias químicas, aplicación que se desea proteger.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la embriotoxicidad de un compuesto que comprende

- 5 (i) poner en contacto dicho compuesto con una célula madre pluripotente que comprende al menos una secuencia codificante que se encuentra bajo el control operativo del promotor del gen de la esterasa diana de neuropatía (NTE) y
- 10 (ii) determinar los niveles de expresión de dicha secuencia codificante

en donde una alteración en los niveles de expresión de dicha secuencia codificante con respecto a los niveles observados en ausencia de dicho compuesto es indicativo de que el compuesto es embriotóxico.

2. Un método según la reivindicación 1 en donde la alteración en los niveles de expresión de dicha secuencia codificante es una disminución con respecto a los niveles observados en ausencia de dicho compuesto.

3. Un método según las reivindicaciones 1 ó 2 en donde la célula madre pluripotente es una célula madre embrionaria.

20 4. Un método según la reivindicación 3 en donde la célula madre embrionaria se encuentra formando parte de un cuerpo embrionario.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la célula madre pluripotente es de ratón o de origen humano.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la determinación de los niveles de expresión de la secuencia codificante se lleva a cabo mediante la determinación de un parámetro seleccionado del grupo consistente en

- 30 (i) los niveles de ARNm correspondiente a dicha secuencia codificante,
- (ii) los niveles de la proteína codificada por la secuencia codificante y
- 35 (iii) la actividad enzimática de la proteína codificada por la secuencia codificante.

7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la secuencia codificante codifica NTE.

8. Un método según la reivindicación 7 en donde los niveles de expresión de la secuencia codificante se determinan mediante la determinación de un parámetro seleccionado del grupo consistente en los niveles del ARNm que codifica NTE y la actividad enzimática de la proteína NTE.

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la secuencia codificante es un gen reportero.

45 10. Una célula que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de interés en donde dicho polinucleótido se encuentra bajo el control del promotor del gen NTE, en donde dicho polinucleótido de interés no comprende una secuencia que codifica NTE.

11. Una célula según la reivindicación 10 en donde dicha célula es una célula madre pluripotente.

50 12. Una célula según la reivindicación 11 en donde dicha célula madre pluripotente es una célula madre embrionaria.

13. Una célula según la reivindicación 12 en donde dicha célula madre embrionaria es de ratón o de origen humano.

55 14. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 en donde dicho polinucleótido que codifica una proteína de interés es un gen reportero.

60 15. Uso de una célula según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 para la determinación de la embriotoxicidad de un compuesto.

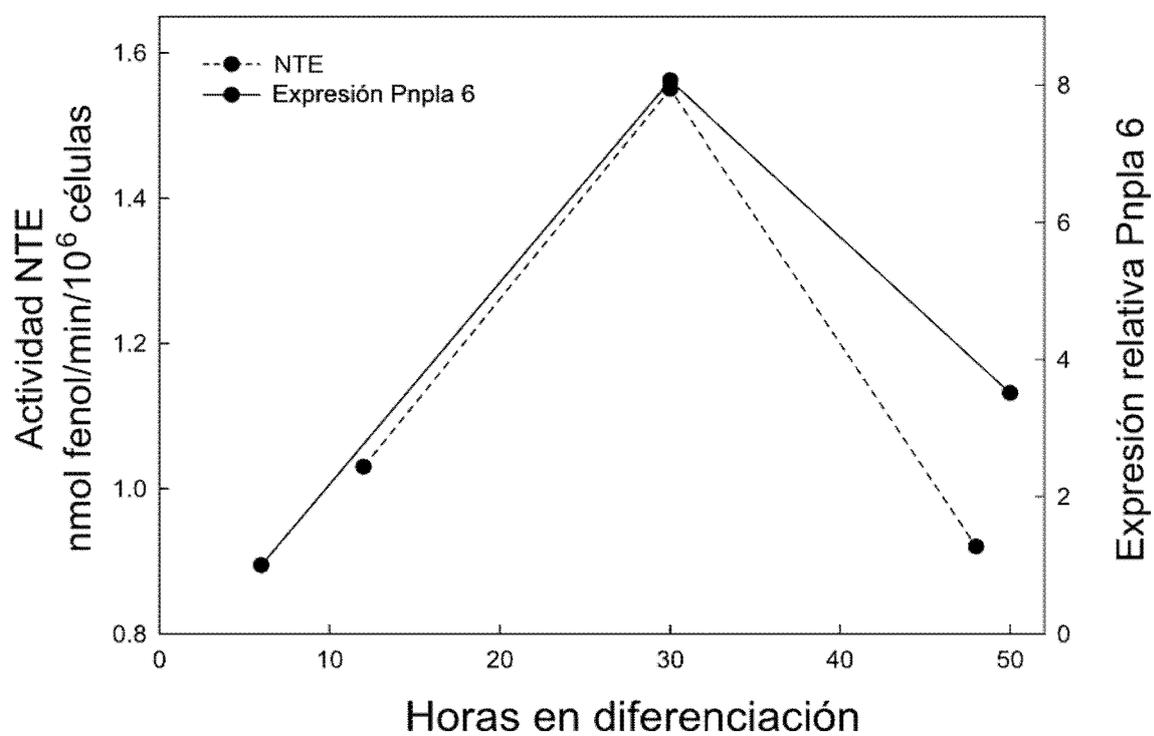


FIGURA 1

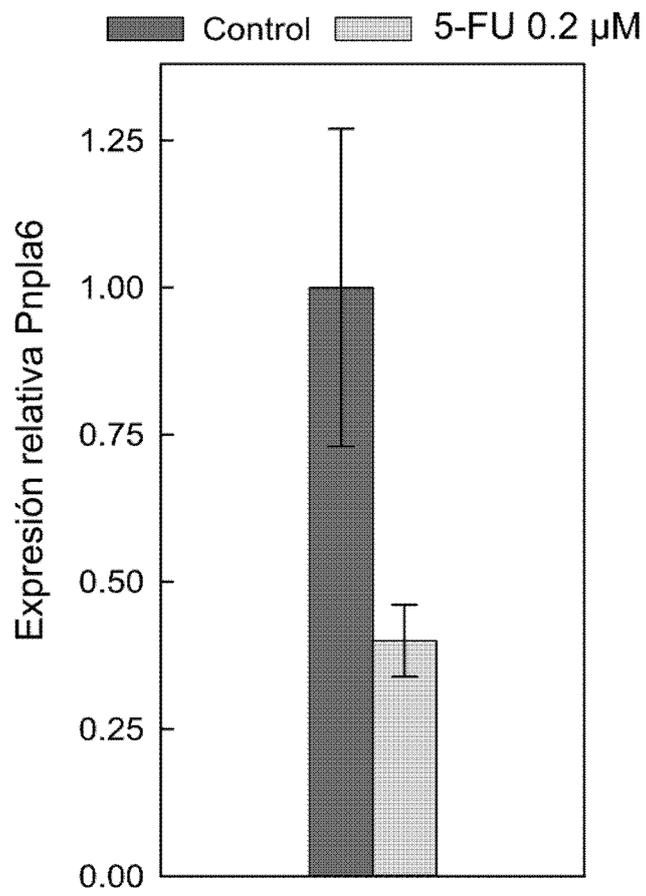


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030065

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.01.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	PAMIES, D., <i>et al.</i> Neuropathy target esterase in mouse embryonic stem cells. Toxicology Letters. 13.09.2009. Vol. 189S, página S65. ISSN 0378-4274. Ver todo el documento.	1-14
Y	MOSER, M., <i>et al.</i> Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. Molecular and Cellular Biology. Febrero 2004. Vol. 24, nº 4, páginas 1667-1679. ISSN 0270-7306 (Impreso). Ver todo el documento, especialmente resumen, 2º párrafo de resultados y primer párrafo de descripción.	1-14
A	CHANG, P-A., <i>et al.</i> Neuropathy target esterase: An essential enzyme for neural development and axonal maintenance. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 16.12.2009 [en línea]. Vol. 42, nº 5, páginas 573-575. doi:10.1016/j.biocel.2009.12.007. ISSN 1357-2725. Ver resumen, apartados 3 y 4, y figura 2.	1-14
A	WINROW, C., <i>et al.</i> Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. Nature genetics. Abril 2003. Vol. 33, nº 4, páginas 477-485. doi:10.1038/ng1131. ISSN 1061-4036 (Impreso). Ver todo el documento.	1-14

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
28.04.2011

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/50 (2006.01)

C12N5/0735 (2010.01)

C12N5/074 (2010.01)

C12N15/12 (2006.01)

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

G01N, C12N

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, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, GeneCards

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	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.

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	PAMIES, D., <i>et al.</i> Toxicology Letters. 13.09.2009. Vol. 189S, página S65. ISSN 0378-4274.	13.09.2009
D02	MOSER, M., <i>et al.</i> Molecular and Cellular Biology. Febrero 2004. Vol. 24, nº 4, páginas 1667-1679. ISSN 0270-7306 (Impreso).	Febrero 2004
D03	CHANG, P-A., <i>et al.</i> International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 16.12.2009 [en línea]. Vol. 42, nº 5, páginas 573-575. doi:10.1016/j.biocel.2009.12.007. ISSN 1357-2725.	
D04	WINROW, C., <i>et al.</i> Nature genetics. Abril 2003. Vol. 33, nº 4, páginas 477-485. doi:10.1038/ng1131. ISSN 1061-4036 (Impreso).	

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 un método para identificar compuestos embriotóxicos que se basa en la capacidad de estos compuestos de reducir la actividad esterasa diana de neuropatía (en adelante NTE). En concreto, se ponen en contacto el compuesto en estudio y una célula madre pluripotente que comprende una secuencia codificante bajo control del promotor de NTE, y se determinan los niveles de expresión de esta secuencia codificante (midiendo los niveles de ARNm, de la proteína codificada, o la actividad enzimática de esta proteína); si estos niveles disminuyen, se deduce que el compuesto es embriotóxico. La solicitud reivindica también una célula madre que contiene una construcción génica formada por el promotor de NTE y una secuencia que no corresponde al gen NTE, y el uso de esa célula para determinar la embriotoxicidad de un compuesto.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el método ni la célula de la invención tal y como están reivindicados, por lo que la solicitud es nueva según el artículo 6(1) de la Ley 11/1986 de Patentes.

Se considera que el documento más cercano del estado de la técnica es D01. Se trata de un estudio del papel de NTE a lo largo del desarrollo embriogénico en ratón. Como en la solicitud, los autores analizan la expresión enzimática y génica de NTE a lo largo del proceso de diferenciación de células madre embrionarias murinas, y los resultados coinciden con los de la solicitud. La diferencia entre D01 y la solicitud es que, aunque en este documento del estado de la técnica se sugiere que el estudio de NTE en estas células embrionarias puede ser un modelo apropiado para estudios de embriotoxicidad, en él no se incluyen datos acerca del efecto de compuestos embriotóxicos sobre la actividad NTE.

En el documento D02 se investiga la función fisiológica de NTE en ratones. Para ello, se inactiva el gen NTE en células madre embrionarias, y se generan de este modo ratones quimera homocigóticos y heterocigóticos para este gen. El documento divulga que la inactivación total de NTE resulta en retraso del crecimiento y del desarrollo y en la subsiguiente muerte del embrión en al día 9,5 de gestación. Es decir, que NTE es esencial para el desarrollo embriogénico.

Por tanto, si el gen NTE es necesario en el proceso de embriogénesis, resultaría evidente deducir que los compuestos que inhiban la expresión del gen tendrían efectos embriotóxicos. Y si, por otro lado, se sabe que este gen se expresa en células madre embrionarias, el experto en la materia no necesitaría ningún esfuerzo inventivo para concluir que la medida de los niveles de expresión de NTE en estas células serviría como modelo para el análisis de posibles compuestos embriotóxicos, por lo que las reivindicaciones 1 a 8 de la solicitud no tendrían actividad inventiva. También sería evidente la construcción de células con un polinucleótido (sea un gen reportero no) bajo control funcional del promotor de NTE (reivindicaciones 9 a 13), y el uso de esas células en estudios de embriotoxicidad (reivindicación 14).

En conclusión, a la luz de lo divulgado en los documentos D01 y D02, la solicitud de patente no cumple el requisito de actividad inventiva del artículo 8(1) de la Ley de Patentes.

En el documento D03 también se estudia el curso temporal de la expresión de NTE en embriones de ratón, y, como en D02, se observa que los ratones en los que se ha eliminado completamente el gen no son viables, y no superan el día 9 de gestación embrionaria. De nuevo, la conclusión es que NTE es esencial para la supervivencia embrionaria. Sin embargo, ya que en este documento no se menciona el uso de células madre ni la posibilidad de utilizar las medidas de los niveles de NTE en métodos de identificación de compuestos embriotóxicos, no se considera que en documento D03 afecte la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

El documento D04, donde también se utilizan ratones en los que se ha inactivado el gen NTE, divulga que los compuestos que inhiben NTE resultan tóxicos para el organismo, y asocian los efectos tóxicos de estos compuestos a la inhibición de la actividad NTE. Puesto que no se trata de estudios específicos de toxicidad en células embrionarias, tampoco el documento D04 afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.